

Centrin-RNAi in *Chlamydomonas reinhardtii*

A: Analysen der Centrinfunktionen anhand eines centrindefizienten
Phänotyps

B: Untersuchungen zur Inaktivierung des Centrin-RNAi-induzierenden
Konstruktes in *Chlamydomonas*

INAUGURAL-DISSERTATION
zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Bettina Koblenz
aus Mülheim an der Ruhr

Köln 2004

Berichtersteller:

Priv.-Doz. Dr. K.-F. Lechtreck

Prof. Dr. M. Hülkamp

Tag der Disputation:

09.07.2004

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Koblenz, B., Schoppmeier, J., Grunow, A. und Lechtreck, K.-F. (2003)

Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J. Cell Sci.* 116:2635-46.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	
Tabellenverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	13
1. Materialien	13
2. Algenstämme und Kulturbedingungen	13
2.1 Algenstämme	13
2.2 Kulturbedingungen der Algen	13
2.3 Kulturbedingungen der Algen zur Analyse der Mitosestadien	14
2.4 Kulturbedingungen der Algen zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Inaktivierung des Konstruktes	14
2.5 Induktion des Nit/RNAi-Stammes durch eine Änderung der Kulturbedingungen	14
2.6 Algenkulturmedium	14
3. Molekularbiologische Methoden	15
3.1 Grundlegende molekularbiologische Methoden	15
3.2 Vektoren, <i>Escherichia coli</i> -Stämme, Anzucht und Lagerung	16
3.3 Aufarbeitung, Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren	16
3.3.1 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	16
3.3.2 Präparation von genomischer DNA aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16
3.3.3 Präparation von RNA aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17
3.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren	18
3.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	18

3.4.1	DNA-Gelelektrophorese	18
3.4.2	RNA-Gelelektrophorese	19
3.5	Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	19
3.5.1	Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southernblot)	19
3.5.2	Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northernblot)	19
3.6	Markierung von DNA-Sonden	20
3.6.1	Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden	20
3.6.2	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	20
3.7	Hybridisierung der Membranen mit den markierten DNA-Sonden	21
3.7.1	Hybridisierung von Northernblots mit markierten Sonden	21
3.7.2	Hybridisierung der Southernblots mit markierten Sonden	21
3.8	Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren	22
3.8.1	Amplifizierung der DNA durch PCR ("polymerase chain reaction")	22
3.8.2	Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor PCrGFP	22
3.8.2.1	Klonierung des Hybridkonstruktes in den Vektor pCrGFP	22
3.8.2.2	Klonierung des Nitratreduktase- Promotors in den Vektor pCrGFP	23
3.8.3	Klonierung des Hybridkonstruktes in den Vektor pCB740	23
3.8.4	Klonierung des zur Kotransformation eingesetzten RNAi-induzierenden Vektors	24
3.9	Transformation von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	24
3.9.1	Transformation des argininbedürftigen Stammes CC-3395	24
3.9.2	Kotransformation mit Vektor pMS171	25
4.	Proteinbiochemische Methoden	25
4.1	Elektrophoretische Methoden	25

4.1.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
4.1.2	Elektrotransfer der Proteine (Westernblot)	26
4.2	Färbungen	27
4.2.1	Coomassiefärbungen der Polyacrylamidgele	27
4.2.2	Ponceaufärbung, reversible Färbung von PVDF-Membranen	27
4.2.3	Amidoschwarzfärbung von PVDF-Membranen	27
4.3	Proteinbestimmung	28
5.	Immunologische Methoden	28
5.1	Antikörper	28
5.2	Immunologischer Nachweis der Proteine des Westernblots	29
5.3	Indirekte Immunfluoreszenz	29
5.3.1	Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten	30
5.3.2	Indirekte Immunfluoreszenz an methanolfixierten Zellen	31
6.	Bestimmung der durchschnittlichen Geißelzahl	31
7.	Präparation der Algen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung	31
8.	FACS ("fluorescence associated cell sorter")	31
9.	Computergestützte Auswertungen	32
9.1	Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen	32
9.2	T-Test (Signifikanztest)	32
III.	Ergebnisse	33
1.	Klonierung und Transformation des RNAi-induzierenden Konstruktes	33
2.	Einfluss des Centrinmangels auf die Anzahl der Geißeln und Basalkörper	35
3.	Einfluss der verminderten Centrinmenge der Zellen auf die Struktur der Basalkörper und der assoziierten Geißeln	39
4.	Auswirkungen des Centrinmangels auf die Prozesse der Zellteilung und auf die Lebensfähigkeit der Stämme	44
5.	Folgen der reduzierten Centrinexpression auf die Organisation der basalkörperassoziierten Fasersysteme und des mikrotubulären Netzwerkes der Zellen	50

6. Einfluss des verminderten Centringehaltes auf die Reifung der Basalkörper	53
7. Design eines induzierbaren RNAi-Konstruktes	55
8. Charakterisierung des induzierbaren RNAi-Stammes	57
9. Zeitlicher Ablauf des Abbaus des Centrinsystems nach der RNAi-Induktion	60
10. Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Inaktivierung des Konstruktes	63
11. PCR-Ansätze zum Nachweis des Konstruktes in der genomischen DNA der inaktiven RNAi-Stämme	66
12. Bestimmung des Methylierungsgehaltes des ausgeschalteten Konstruktes	66
13. Einfluss des Konstruktaufbaus auf den Prozess der Inaktivierung	70
14. Untersuchungen zur Dauerhaftigkeit des Verlustes des RNAi-Effektes unter repressiven Bedingungen	73
IV. Diskussion	75
A) Analyse der Centrinfunktionen über einen centrindefizienten Phänotyp	75
B) Untersuchungen zur Inaktivierung des RNAi-induzierenden Konstruktes	87
V. Zusammenfassung	95
Summary	97
VI. Literaturverzeichnis	98
VII. Anhang	109
Danksagung	
Erklärung	
Lebenslauf	

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Design des RNAi-induzierenden Vektors pCB740/RNAi	34
Abb. 2: Charakterisierung des Kontrollstammes und der RNAi-Stämme I A7, I A10 und II N41	37
Abb. 3: Auswirkungen des Centrinmangels auf die Basalkörperzahl und die Fähigkeit zur Geißelgenerierung	40
Abb. 4: Bestimmung der, mit den Basalkörpern assoziierten relativen Centrinmenge der RNAi-Stämme I A7 und I A10	43
Abb. 5: Fluoreszenzaufnahmen von Kontroll- und RNAi-Zellen während der Mitose	46
Abb. 6: Einfluss der verringerten Centrinmenge auf die Prozesse der Zellteilung	48
Abb. 7: Die Folgen der variierenden Basalkörperzahl in RNAi-Zellen auf die Ausbildung der tubulären Wurzeln bzw. des tubulären Cytoskeletts	52
Abb. 8: Die Folgen des Centrinmangels auf die Reifung der Basalkörper	54
Abb. 9: Übersicht zur Funktion und Effizienz des RNAi-induzierenden Konstruktes	56
Abb. 10: Übersicht über den induzierbaren RNAi-Stamm Nit/RNAi	59
Abb. 11: Abbau des Centrinsystems in den Zellgenerationen des Nit/RNAi-Stammes nach Induktion des Konstruktes	62

Abb. 12:	Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung des RNAi-induzierenden Konstruktes unter der Kontrolle des HSP70A/rbcS2-Fusionspromotors	65
Abb. 13:	Southerblots zur Bestimmung des Methylierungsgrades der inaktivierten RNAi-induzierenden Konstrukte	69
Abb. 14:	Kreuztransformation zur Ermittlung der Sequenzspezifität des Prozesses, der zum Ausschalten der Konstrukte führte	71
Abb. 15:	Versuche zur Haltbarkeit des Signals, welches unter induzierenden Bedingungen zum Verlust des RNAi-Effektes führte	73

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Übersicht über Geißel- bzw. Basalkörperzahlen in dem Kontrollstamm und den RNAi-Stämmen I A7, I A10 und II N41	35
Tabelle 2: Übersicht über die pCB740/RNAi-Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden	38
Tabelle 3: Übersicht der Geißel- bzw. Basalkörperzahlen der für die Mitoseversuche eingesetzten Kontroll- und RNAi-Stämme	45
Tabelle 4: Übersicht über die zur Einzelzellanalyse eingesetzten Stämme pf15, VI E5 und VII G4	49
Tabelle 5 : Übersicht über die Anzahl der Geißeln des Nit/RNAi-Stammes im zeitlichen Verlauf nach der Induktion des Promotors	60
Tabelle 6: Übersicht über den Verlust des RNAi-Effektes des Stammes Nit/RNAi unter induzierenden Bedingungen	64
Tabelle 7: Übersicht über die Empfindlichkeit der Centrinfunktionen gegenüber einer sinkenden Centrinmenge in unterschiedlichen RNAi-Stämmen	86

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Aqua dest.	Millipore gefiltertes Wasser (reinst)
AK	Antikörper
mAK	monoklonaler Antikörper
pAK	polyklonaler Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BK	Basalkörper
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	cirka
cDNA	copy-DNA
CEN-1	humanes Centrin 1
CEN-2	humanes Centrin 2
CEN-3	humanes Centrin 3
CEN-4	humanes Centrin 4
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
g	Gramm
GFP	„green fluorescent protein“
GTP	Guanosintriphosphat
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	kilo Dalton
l	Liter
ml	Milliliter

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
MCS	"multiple cloning site"
MT	Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes-Zentrum
N-terminal	aminoterminal
MW	Mittelwert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PTGS	"posttranscriptional gene silencing"
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	"RNA interference"
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
sek	Sekunde
s.o.	siehe oben
SPB	Spindelpolkörper
Stabw	Standardabweichung
s.u.	siehe unten
TGS	"transcriptional gene silencing"
U	Units
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vfl	"variable flagella number"
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp

I. Einleitung

Das Centrosom eukaryotischer Zellen organisiert die cytoplasmatischen Mikrotubuli der Interphase, sowie die Spindelmikrotubuli während der Zellteilung. Es wird demnach auch als mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC) bezeichnet (Mitchison und Kirschner, 1984; Kellogg et al., 1994). Die Centrosomen der Eukaryoten - verglichen in Vertebraten, Hefe und begeißelte Grünalgen - weisen Unterschiede in Morphologie und Zusammensetzung auf. Dennoch konnte in letzter Zeit vermehrt gezeigt werden, dass sie homologe Proteine enthalten, die möglicherweise ähnliche Funktionen ausüben (Kalt und Schliwa, 1993). Ein Protein, welches in vielen centrosomalen Strukturen nachgewiesen wurde ist z.B. γ -Tubulin. Für γ -Tubulin konnte eine direkte Beteiligung an der Nukleation von Mikrotubuli gezeigt werden (Oakley und Oakley, 1989; Wiese und Zheng, 2000). Centriolen, die von pericentrioläres Material umgeben sind, stellen die Centrosome in Vertebraten (Kellogg et al., 1994). Das funktionale Äquivalent der Hefe ist der Spindelpolkörper (SPB). Er besteht aus einer mehrschichtigen Struktur, die in die Kernmembran eingebettet ist (Adams und Kilmartin, 2000). Baugleich zu den Centriolen sind in vielen begeißelten Zellen die Basalkörper (BK). Diese konservierten zylindrischen Strukturen münden in Grünalgen über eine sternförmige Übergangsregion in die Axonema der Geißeln (Salisbury, 1998). Basalkörper bzw. Centriolen sind aus neun miteinander verbundenen Mikrotubulitriplets aufgebaut. Acentriolären Zellen, wie z.B. die Zellen höherer Pflanzen, besitzen keine mit den Centriolen vergleichbare Strukturen. In diesen Zellen geht die Organisation der Mikrotubuli von weniger strukturierten, „flexiblen“ MTOCs aus (Lambert, 1993). Auch die Pole der Teilungsspindeln sind in diesen Fällen weniger fokussiert (Übersicht in Vaughn und Harper, 1998).

Es wird vermutet, dass die Basalkörper bzw. Centriolen bedeutend während der Organisation des pericentriolären Materials sind und ihre Verdopplung zusätzlich als ein Kontrollmechanismus zur Duplikation des Centrosoms dient (Bobinnec et al., 1998; Marshall und Rosenbaum, 2000). Diese Funktionen erfordern eine strikte Regulierung der Duplikation und der mitotischen Aufteilung der Basalkörper bzw. Centriolen, da eine abweichende Anzahl an Centrosomen in der Zelle zu Fehlern während der Organisation der Spindelmikrotubuli und somit zu Aufteilungsdefekten der Chromosomen führen kann. Die regulierte Bildung neuer BK/Centriolen wird über

zwei verschiedene Prozesse ermöglicht (Marshall et al, 2001). Eine Möglichkeit ist die Neubildung von Basalkörpern und Centriolen, wie es z.B. beim Übergang der amöboiden zur begeißelten Lebensform des Amoeboflagellats *Naegleria gruberi* für die Basalkörper beschrieben wurde (Fulton und Dingle, 1971). Einen wichtigen Aspekt der Spermiogenese der Farnpflanzen und einiger Gymnospermen ist die Neubildung von Basalkörpern im sog. „Blepharoplasten“. Die bis zu 1000 Basalkörper der Spermatozoiden des Ginkgos werden z.B. im Blepharoplasten gebildet (Strasburger, 34. Auflage, 1998). Es handelt sich hierbei um einen Bezirk aus verdichtetem Cytoplasma, der über mehrere Zellteilungen hinweg als MTOC fungiert und die cytoplasmatischen Mikrotubuli der Interphase, sowie die Pole der Mitosespindel organisiert (Übersicht siehe Vaughn und Harper, 1998).

Im „templated pathway“ der Basalkörperbildung hingegen dient der bereits vorhandene Basalkörper bzw. das bereits vorhandene Centriol als Matrize zur Duplikation. Die so gebildeten BK und Centriolen entstehen in einem bestimmten Winkel proximal zu den bereits Vorhandenen (Kellogg et al., 1994). Dieser Verdopplungsprozess findet in der Regel einmal pro Zellzyklus, während des Übergangs der G1- in die S-Phase statt. Während der folgenden Mitose findet dann eine semikonservative Aufteilung der BK/Centriolen statt, so dass jede Tochterzelle zwei unterschiedlich alte Basalkörper bzw. Centriolen besitzt (Kochanski und Borisy, 1990).

Centrin

Ein Protein, das in vielen eukaryotischen Zellen ein Bestandteil des Centrosoms darstellt, ist Centrin (syn. Caltractin, Cdc31p). Ihm wird eine bedeutende Rolle während der Centrosomverdopplung und der Kontraktion centrinhaltiger Fasern zugesprochen (Übersicht in Salisbury, 1995). Es handelt sich bei Centrin um ein ubiquitär verbreitetes 20 kDa-Protein der Familie der calciumbindenden Proteine, zu denen auch Parvalbumin, Calmodulin und Troponin C gezählt werden (Salisbury et al., 1988). Sequenzvergleiche zwischen menschlichen Centrin und den Centrinen aus *Chlamydomonas* und *Atriplex nummularia* (einer höheren Pflanze) mit *S. cerevisiae* CDC-31p (ein Centrinhomolog, siehe unten) zeigen eine Identität von 68%, 57% und 54% (Schiebel und Bornens, 1995). Der N- und C-Terminus des Proteins zeigt dabei die größte Divergenz.

Centrin weist hohe Homologien zu Calmodulin auf, einem calciumbindenden Protein, das in nahezu allen eukaryotischen Zellen als Calciumsensor dient (Kawasaki und Kretsinger, 1995). In beiden Proteinen wird die Komplexierung von Calcium über das Strukturmotiv der EF-Hand geleistet. Dieses Motiv ist durch eine konservierte Sequenz charakterisiert, die eine Länge von 29 Aminosäuren aufweist. Sie wird durch eine kurze Helix, eine folgende Schleife und einer weiteren Helix gebildet. Die Schleife zwischen den beiden Helices stellt die Calciumbindungsstelle dar (Stryer, 4. Auflage, 1996). Die unterschiedliche Affinität der Calcium-Bindung durch die vier EF-Hände wurde für Centrin aus *Chlamydomonas reinhardtii* in der Arbeit von Weber et al. (1994) gezeigt.

Lokalisierung und Funktion Centrins in *Chlamydomonas reinhardtii*

Der Basalapparat, der aus den Basalkörpern und diversen assoziierten Strukturen besteht, ist das mikrotubuli-organisierende Zentrum der Grünalgen. Die beiden Basalkörper des Basalapparates sind über eine distale Verbindungsfibrille miteinander verbunden und münden über eine sternförmige Übergangsregion in die Axonema der Geißeln. Die mit dem Basalapparat assoziierten Geißelwurzeln werden aufgrund ihrer Zusammensetzung in mikrotubuläre und fibrilläre Geißelwurzeln unterschieden (Anderson et al., 1991). In begeißelten Zellen der Grünalgen ragen in der Regel vier mikrotubuläre Geißelwurzeln vom proximalen Ende der Basalkörper in die Zellen. Sie zeichnen sich durch das Vorkommen von acetyliertem Tubulin aus (LeDizet und Piperno, 1986). Die fibrillären Geißelwurzeln wiederum sind in System-I- und System-II-Fibrillen unterteilt. System-I-Fibrillen verlaufen parallel zu den mikrotubulären Geißelwurzeln (Lechtreck und Melkonian, 1991). Eine Hauptkomponente dieser Geißelwurzeln ist SF-Assemblin (Lechtreck und Melkonian, 1991). Die kontraktile System-II-Fibrillen verbinden die Basalkörper mit dem Kern ("nucleus-basal body-connectors", NBBCs), der Plasmamembran oder den Chloroplasten und bestehen zu einem hohen Anteil aus Centrin (Salisbury et al., 1984, Schulze et al., 1987). Isoliert und identifiziert wurde Centrin erstmals aus den System-II-Fibrillen von *Tetraselmis striata* (Salisbury et al, 1984).

Centrin ist darüber hinaus in zwei weiteren Strukturen des Basalapparates lokalisiert, in der distalen Verbindungsfibrille, die die beiden Basalkörper miteinander verbindet und in der Sternstruktur der Übergangsregion, die den Basalkörper in das Axonema der Geißel überleitet (Salisbury et al., 1988). Centrinbasierende Fibrillen teilen

bestimmte Eigenschaften, so bestehen sie meist aus Protofilamenten mit einem Durchmesser von 3-8 nm (Coling und Salisbury, 1992). Darüber hinaus ermöglicht Centrin eine Kontraktion dieser Fibrillen durch Bindung von Calcium. Freie Calciumkonzentrationen von $\geq 10^{-7}$ M Ca^{2+} bewirken eine Kontraktion innerhalb von Millisekunden, die ATP-unabhängig vollzogen wird (Wiech et al., 1996; Hayashi, 1998). Die Prozesse des Wiederausdehnens dieser Fasern sind bisher nicht geklärt, da sie wahrscheinlich nicht nur auf der Freisetzung des Calciums basieren. ATP-Hydrolyse und/oder Proteinphosphorylierungen werden als regulative Prozesse diskutiert (Salisbury, 1998). Diese Beobachtungen stützen sich auf die Tatsache, dass Centrin durch Phosphorylierung von der α -Form in die β -Form überführt werden kann (Salisbury et al., 1984). Beide Formen Centrins sind *in vivo* nachweisbar. Die Rolle der Phosphorylierung Centrins wurde bisher in ihrer Funktionsweise nicht hinreichend verstanden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Prozesse der Kontraktion und Wiederausdehnung von denen der Phosphorylierung und Dephosphorylierung unter bestimmten Bedingungen (Hitzeschock und andere Schockbehandlungen) entkoppelt werden können (Martinsdale und Salisbury, 1990).

Während der Mitose in *Chlamydomonas reinhardtii* findet eine starke Umorganisation des beschriebenen Centrinsystems der Interphase statt. Während des Übergangs in die Preprophase kontrahieren die centrinhaltigen Strukturen, die Kontraktion der NBBCs bringt so den Kern in die Nähe des Basalapparates (Coss, 1974). Dieser Prozess geht mit einer Veränderung der Zellform und einer vermehrten Tubulinsynthese einher (Ares und Howell, 1982; Piperno und Luck, 1977). Zudem werden die Geißeln in die Zellen eingezogen (Coss, 1974; Salisbury, 1988). In der Prophase teilt sich dann der Basalapparat durch eine Separation der Basalkörper. Vor der Metaphase wandern die beiden Hälften zu den gegenüberliegenden Polen der entstehenden Spindel. In der Metaphase bleiben die Basalkörper mit den Spindelpolen assoziiert (z.B. Wright et al., 1989). Während der Telophase findet eine erneute Organisation der centrinhaltigen Strukturen statt, so dass während der Cytokinese die beiden Kerne bereits mit dem Basalapparat der Interphase assoziiert sind (Salisbury et al., 1988). Da die centrinhaltigen Strukturen während der gesamten Mitose mit den Basalkörpern assoziiert sind, wird angenommen, dass ihnen eine Kontrollfunktion während der Aufteilung der Basalkörper zukommt (z.B. Kuchka und Jarvik, 1982; Wright et al., 1985; siehe unten).

Centrin und seine Funktion als centrosomales Protein in verschiedenen Organismen

Chlamydomonas reinhardtii

Eine Punktmutation in dem Centringen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* bewirkt einen Phänotyp, der sich durch eine variable Anzahl an Geißeln ("variable flagella number", vfl), ein abberantes Schwimmverhalten und durch eine gestörte Phototaxis auszeichnet (Taillon et al., 1992). Defekte in der sternförmigen Übergangsregion, der distalen Verbindungsfibrille und der NBBCs werden als Ursache für diese Merkmale diskutiert (Sanders and Salisbury, 1994; Hayashi et al., 1989; Wright et al., 1989). Zellen dieses *vfl2*-Stammes weisen nur noch 20-25% des Wildtyp Centrin Gehaltes auf (Wright et al., 1989).

Die unterschiedliche Anzahl an Geißeln pro Zelle wird auf Fehlverteilungen der Basalkörper während der Mitose zurückgeführt. Als Ursache für diese Segregationsdefekte wird das Fehlen der Verbindung zwischen Kern und Basalkörper (NBBCs) diskutiert (Wright et al., 1989). Da *vfl2*-Zellen die Mitose und die folgende Zellteilung korrekt durchlaufen, sprechen die Beobachtungen in der Mutante gegen essentielle Funktionen Centrins in *Chlamydomonas reinhardtii* bei diesen Prozessen. Im Gegensatz dazu lassen die Untersuchungen den Schluss zu, dass Centrin notwendig ist, um die Positionierung und die mitotischen Aufteilung der Basalkörper zu garantieren (Wright et al., 1989).

Saccharomyces cerevisiae

Die Spindelpolkkörper (SPB) der Hefe und anderer Pilze sind das funktionelle Äquivalent zum Centrosom der höheren Tiere. In *Saccharomyces cerevisiae* ist der SPB eine mehrschichtige Struktur, die während des gesamten Zellzyklusses in die Kernmembran eingebettet ist und die Organisation sowohl der cytoplasmatischen wie auch der Spindelpolmikrotubuli ermöglicht (Übersicht in Adams und Kilmartin, 2000). Der SPB ist mit einer weiteren Struktur der sog. "Half-bridge" assoziiert. Diese Struktur ist bedeutend während der Prozesse der SPB-Duplikation.

Cdc31p, ein centrin-homologes Protein in *Saccharomyces cerevisiae*, wurde in dieser "Half-bridge" identifiziert (Huang et al., 1988; Spang et al., 1993). Eine direkte Interaktion zwischen Cdc31p und Kar1p, einem weiteren Protein der „Half-bridge“,

konnte in den Arbeiten von Biggins und Rose (1994) gezeigt werden. Identifiziert wurde Kar1p durch seine Funktion während der Karyogamie und der Verdopplung der SPB (Conde und Fink, 1976). Kar1p ist an der cytoplasmatischen Seite der "Half-bridge" lokalisiert und ermöglicht so wahrscheinlich über eine Interaktion mit Cdc31p die Verankerung dieser Struktur in der Kernmembran (Vallen et al., 1992). Cdc31p- und Kar1p-Mutanten weisen den gleichen Phänotyp auf, was den Verdacht stützt, dass beide Proteine an denselben Prozessen während der Verdopplung der SPB beteiligt sind. Beide Mutanten arretieren als knospende Zellen mit nur einem SPB in der G2/M-Phase (Ivanovska und Rose, 2001).

Auch für Sfp und Msp3p, zwei weiteren Proteine der "Half-bridge", konnte eine direkte Interaktion mit Cdc31p nachgewiesen werden (Kilmartin, 2003; Jaspersen et al., 2002). Sfp wird für die Organisation der Spindel benötigt, ein "knock-out" des Gens führt zu einer Arretierung der Zellen in der G2/M Phase (Ma et al., 1999). Einige Mutanten mit Deletionen im sfi-Gen können die Verdopplung der SPB nicht mehr ermöglichen. Dieser Phänotyp kann durch die Überexpression von Cdc31p komplementiert werden (Kilmartin, 2003). Sequenzanalysen ergaben homologe Proteine im Menschen, in Mäusen (Salisbury, 2004), sowie in *Chlamydomonas reinhardtii* (Dr. K.-F. Lechtreck, persönliche Mitteilung). Studien mit humanen Sfp bestätigen die centrosomale Lokalisation der Centrin-Sfp-Komplexe (Salisbury, 2004). Auch ein "knock-out" von Msp3p inhibiert die Duplikation der SPB (Jaspersen et al., 2002). Da der Phänotyp der hier beschriebenen Mutanten identisch ist, wird angenommen, dass alle vier Proteine essentielle Funktionen während des gleichen Schrittes der frühen SPB-Duplikation ausüben.

Ein weiteres centrinbindendes Protein, welches in Hefe isoliert wurde, ist Kic1p (Sullivan, 1998). Hierbei handelt es sich um eine Proteinkinase, die wahrscheinlich an Prozessen der Zellintegrität und Morphologie beteiligt ist, hingegen keine Funktion während der SPB-Duplikation aufweist. Da die Funktion der Kinase in Cdc31p-Mutanten defekt war, handelt es sich hier wahrscheinlich um eine Cdc31p-regulierte Aktivität (Sullivan, 1998).

***Marsilea vestita* (Wasserfarn)**

Die Spermiogenese in den männlichen Gametophyten des Wasserfarns *Marsilea vestita* resultiert in der Bildung geißeltragender Gameten. Die "de novo"-Bildung der Basalkörper in den Gameten geschieht im Blepharoplasten. Der Blepharoplast

fungiert in diesen Zellen als MTOC, indem es die cytoplasmatischen Mikrotubuli während der Interphase organisiert und die Spindelpole während den mitotischen Zellteilungen bildet (Übersicht in Vaughn und Harper, 1998; Strasburger, 34. Auflage, 1998).

In der Arbeit von Klink und Wolniak (2001) konnte dargestellt werden, dass ein Abbau der im Blepharoplasten gespeicherten Centrin-mRNA die Bildung von begeißelten Zellen und somit auch die "de novo"-Bildung von Basalkörpern inhibierte. Unter Abwesenheit von Centrin finden die mitotischen Zellteilungen des Gametophyten nicht statt, der Blepharoplast bildet sich nicht und die Spermiogenese arretiert vor der Bildung des Basalapparates (Klink und Wolniak, 2001).

Mensch

In menschlichen Zellen konnten bislang vier Centringene identifiziert werden. Die vier Genprodukte lassen sich aufgrund ihrer Homologien zwei Unterfamilien zuordnen, wobei Cen-1, Cen-2 und Cen-4 eine höhere Identität zu Centrin aus Algen aufweisen, während Cen-3 näher verwandt ist mit CdC31p (Gavet et al., 2003; Middendorp et al., 1997). Im Gegensatz zu Cen-1, welches meistens in männlichen Keimzellen exprimiert wird, findet die Expression von Cen-2 und Cen-3 ubiquitär statt (Paoletti et al., 1996; Hart et al., 1999). Die Expression von Cen-4 wiederum ist auf cilientragende Zellen beschränkt (Gavet et al., 2003). Das Vorkommen von vier unterschiedlichen Centrinen, sowie ihr abweichendes Expressionsmuster im Menschen, lässt die Vermutung zu, dass die Proteine verschiedene Funktionen ausüben.

Salisbury et al. (2002) zeigten, dass der "knock-down" der Cen-2 Expression in HeLa Zellen darin resultierte, dass sich die Centriolen nicht mehr duplizierten. In der folgenden Mitose teilte sich das noch vorhandene Centriolenpaar und organisierte die Spindel mit nur einer Centriole pro Spindelpol. Die durch die folgende Teilung gebildeten Tochterzellen besaßen demnach nur je eine Centriole. Einige dieser Zellen durchliefen eine bzw. zwei weitere Zellteilungen und bildeten so Tochterzellen mit einer bzw. keiner Centriole. Zellen, die keine Centriolen mehr besaßen, konnten die Prozesse der folgenden Cytokinese nicht mehr durchlaufen und führten demnach zu mehrkernigen Zellen, die dann starben (Salisbury et al., 2002).

Einführung in den Mechanismus “RNA interference“

Die Regulation der Genaktivität über eine Verminderung der RNA-Menge, das sog. “RNA silencing“, wurde in Pflanzen, Tieren und Pilzen unabhängig voneinander beschrieben. “RNA silencing“ Phänomene kontrollieren neben der Genexpression u.a. auch die Unterdrückung von Transposons und RNA-Viren, welches als Schutzmechanismus der Wirtsorganismen dient. Auslöser dieser vielfältigen Regulationsmöglichkeiten ist das Vorkommen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Zellen, die zu kurzen Fragmenten (“small interfering RNA“; siRNA) abgebaut wird. Diese dsRNAs kann über Interaktionen mit Enzymkomplexen den Abbau (“posttranscriptional gene silencing“; PTGS/RNAi) bzw. die Modifikation (“transcriptional gene silencing“; TGS) homologer Nukleinsäuren einleiten (Übersicht in Hannon, 2002).

Erste Hinweise auf die Prozesse des “posttranscriptional gene silencing“ wurden in Pflanzen beschrieben. Das Einbringen eines Transgens resultierte hier in einigen Transfomanten in einem Rückgang der Transkriptmenge sowohl des Transgens, wie auch des homologen endogenen Gens (“cosuppression“; Napoli et al., 1990). Das Vorkommen dieser Mechanismen zur Regulierung der Genaktivität wurde folgend in fast allen eukaryotischen Organismen bestätigt. So wurden ähnliche Phänomene in Pilzen als „Quelling“ (Cogoni et al., 1996), in Tieren als “RNA interference“ (RNAi; Fire et al., 1998) beschrieben. Als induzierende Faktoren wurden u.a. Mehrfachintegrationen von Transgenen, abweichende RNA-Formationen sowie die Wiederholung zum Teil invertierter Strukturen (“inverted repeats“) von Viren bzw. Transgenen identifiziert (Matzke et al., 2001).

Der RNAi-Grundmechanismus kann generell in zwei Schritte unterteilt werden, den Initiations- und den Effektorschritt. Während der Initiation wird eine lange doppelsträngige RNA in kurze Stücke zerlegt (“small interfering RNA“, siRNA), die eine Länge von ca. 21-25 Nukleotiden aufweisen. Diese Zerlegung wird von dem hochkonservierten Enzym Dicer bzw. einem Dicerhomolog der RNaseIII-Enzymfamilie unter ATP-Verbrauch katalysiert (Zamore et al., 2000). Charakteristisch für ein RNaseIII-Produkt weisen siRNAs einen 2-3-Nukleotid-langen Überhang und eine Hydroxylgruppe am 3'Ende, sowie eine Phosphatgruppe am 5'Ende auf (Elbashir et al., 2001). Diese Modifikation am 5'Ende ist Voraussetzung für die Bildung eines Protein-RNA-Komplexes zwischen der siRNA und dem

Multiproteinkomplex RISC ("RNA-induced silencing complex"), welches den zweiten Schritt des RNAi-Mechanismus einleitet. Die Aktivierung dieses RISC-siRNA-Komplexes findet unter ATP-Hydrolyse statt und resultiert in einer Entwindung der doppelsträngigen RNA in Einzelstränge (Nykänen et al., 2001). Der "antisense" Strang des RNA-Fragmentes kann somit als Matrize zur Erkennung der homologen mRNA ("messenger RNA") durch den RISC-siRNA-Komplex dienen (Martinez et al., 2002). Die folgende endonukleolytische Spaltung der homologen RNA findet in der Mitte, der aufgrund von Sequenzhomologien gepaarten Region aus dem siRNA-Molekül und der homologen mRNA, statt (Zamore et al., 2000). Die so entstandenen Fragmente der mRNA sind nun wahrscheinlich ein Substrat für den katalytischen Abbau durch Exoribonukleasen (Zamore et al., 2000).

RNAi-Phänomene sind u.a. in Pflanzen als systemisch beschrieben worden. Bereits geringe Dosen der dsRNA reichen aus, einen dauerhaften und ausbreitenden Effekt zu bewirken (Fagard und Vaucheret, 2000). Aufgrund dieser Beobachtung wird die Verstärkung des auslösenden Signals durch Amplifizierung mittels RdRPs ("RNA-dependent RNA Polymerasen") diskutiert. Lipardi et al. (2001) konnten zeigen, dass die Generierung von dsRNA durch diese Polymerasen katalysiert wurde. Die so entstandenen dsRNA diente wiederum als ein Substrat für den Dicer-vermittelten Abbau. Darüber hinaus weist die Modifikation der siRNA auf eine eventuelle Primerfunktion hin und könnte somit für die Amplifikation neuer dsRNA dienen. Auch die durch den Abbau von Exonukleasen entstandenen Fragmente der ursprünglichen Ziel-mRNA können als Primer zur Amplifizierung neuer dsRNA dienen (Sijen et al., 2001). Amplifizierung durch RdRPs kann demnach sowohl während des Initiationschrittes als auch nach dem Effektorschritt stattfinden. Die Amplifizierung des Signals konnte sowohl in Pflanzen, wie auch in *C. elegans*, *N. crassa* und *Dictyostelium discoideum* nachgewiesen werden. In *Drosophila melanogaster* und in Säugetieren konnte dies hingegen nicht detektiert werden (Cerutti, 2003).

Der Nachweis von dsRNA als Effektor für Veränderungen im Genom zeigt die wahrscheinlich enge Verbindung zwischen TGS und PTGS. So wurde dsRNA als Auslöser von DNA-Methylierungen identifiziert (hauptsächlich in Pflanzen, Sijen und Kooter, 2000) und ist an der Ausbildung von Heterochromatinstrukturen (Tabara et al., 1999) und der programmierten Eliminierung von DNA im Makronukleus von *Tetrahymena pyriformis* beteiligt (Mochizuki et al., 2002). Diese drei Phänomene

können zu einem Abschalten der entsprechenden Genbereiche führen (“transcriptional gene silencing“; Übersicht in Agrawal, 2003).

Micro-RNA (miRNA)

Micro-RNAs, eine weit verbreitete Gruppe nicht kodierender kurzer RNAs, besitzen regulatorische Funktionen beispielsweise bei der Steuerung von Entwicklungs- und Zellzyklusprozessen (Ambros, 2003). Reife miRNAs weisen eine Länge von ca. 20-25 Nukleotide auf und dienen als Erkennungssequenz der 3`UTR, der zum Abbau bestimmten mRNA (“mismatches“; Pasquinelli et al., 2002). Die ausgebildeten Basenpaarungen zwischen der miRNA und der mRNA finden unter weniger stringenten Bedingungen statt. Sie kann demnach Lücken und Fehler aufweisen (Pasquinelli et al., 2002). Im Gegensatz zu siRNAs sind miRNAs in der Regel als einzelsträngige Fragmente detektierbar, die aus längeren Vorläufer-miRNAs (“pre miRNA“) gebildet werden. Diese Vorläufer-miRNAs weisen in Tieren meist eine Länge von 60-70 Nukleotiden auf und bilden nicht perfekt gepaarte doppelsträngige Regionen innerhalb der Sequenz aus (Agrawal et al., 2003). Die Vorläufer-miRNAs der Pflanzen sind oft bis zu dreimal so lang und können mehrere doppelhelicale Bereiche ausbilden (Reinhart et al., 2002). Die Prozessierung dieser Vorläufer-miRNAs findet wiederum, wie auch für die siRNAs beschrieben, durch Dicer bzw. dicerhomologe Enzyme statt (Hannon, 2002). In dem nachfolgenden Schritt findet auch hier eine Assoziation mit einem Riboproteinkomplex statt. In einigen Fällen liegt der Verdacht nahe, dass es sich hier um den identischen RISC-Proteinkomplex des siRNA-Mechanismus handeln könnte (Hutvágner und Zamore, 2002).

Bei Pflanzen findet die Prozessierung der Vorläufer-miRNAs zu miRNAs durch das Dicer-Homolog CAF1 statt. Da dieses Enzym im Kern lokalisiert ist, handelt es sich hier eventuell um einen Prozess, der kotranskriptional bzw. unmittelbar nach der Transkription stattfindet (Jacobsen et al., 1999).

TGS bzw. PTGS Mutanten in *Chlamydomonas reinhardtii*

Cerutti und Mitarbeiter identifizierten bei einer Suche in *Chlamydomonas reinhardtii* drei verschiedene Stämme, in denen die “knock-out“ Mutation des jeweiligen Gens (Mut6, Mut9 und Mut11) ein zuvor ausgeschaltetes Transgen reaktivierte. Die Daten dieser Untersuchungen sind in den Arbeiten von Wu-Scharf et al. (2000), Zhang et

al. (2002) und Jeong et al. (2002) dargestellt und werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

Mut6p stellt wahrscheinlich eine Komponente des PTGS-Mechanismus dar und übt Funktionen während des Abbaus der dsRNA in den Zellen aus. Da der mutierte Stamm eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien aufweist, wird eine weitere Rolle des Proteins während der DNA-Reparatur angenommen. Mut6p konnte als Mitglied der Familie der DEAH-Box beinhaltenden RNA-Helikasen charakterisiert werden. Darüber hinaus weist es glycinreiche Bereiche mit vielen RGG-Wiederholungen auf. Dies legt nahe, dass es sich bei Mut6p um ein Protein mit RNA-Bindungs- und Protein-Protein-Interaktionsdomänen handeln könnte. Mut6p weist zusätzlich drei potentielle Kernlokalisationssequenzen auf und übt somit seine Funktionen wahrscheinlich im Kern aus (Wu-Scharf et al., 2000).

Mut9 und mut11 wurden wiederum als Mutanten während der Prozesse des TGS isoliert. Ebenso wie bei Mut6, war auch hier eine erhöhte Mobilität von Transposons und eine verringerte Toleranz gegenüber DNA-schädigenden Reagenzien nachzuweisen. Die Ergebnisse zur Charakterisierung der Stämme legen nahe, dass es sich hier um zwei Proteine handelt, die in unterschiedliche methylierungs-unabhängige Wegen des TGS involviert sind. Mut9p wurde als neue Serin/Threonin-Proteinkinase charakterisiert und besitzt eventuell eine Bedeutung während der durch Phosphorylierung bewerkstelligten Organisation der Chromatinstruktur (Jeong et al., 2002). Mut11p hingegen weist Homologien z.B. zu dem transkriptionalen Repressor Tup1p in *S. cerevisiae* auf. Dieser reguliert die Transkription durch direkte Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie und verändert darüber hinaus lokale Chromatinstrukturen durch die Positionierung von Nukleosomen bzw. durch die Vermittlung von Histonmodifikationen (Smith und Johnson, 2000). In Analogie zu Tup1p wird diskutiert, dass auch Mut11p TGS durch die direkte Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie sowie durch die Ausbildung repressiver Chromatinstrukturen ermöglicht (Zhang et al., 2002; siehe auch Diskussion).

RNAi-induziertes “gene silencing“ in *Chlamydomonas reinhardtii*

Da das Ausschalten von Genen durch homologe Rekombination in *Chlamydomonas reinhardtii* nicht sehr effektiv ist (Gumpel et al., 1994; Sodeinde und Kindle, 1993), bietet die Induktion von RNAi in den Zellen eine gute Alternative zur Genregulierung durch “knock-down“. RNAi, als Methode zur spezifischen Verminderung der

Genexpression wurde in *Chlamydomonas reinhardtii* bereits in den Arbeiten von Fuhrmann et al. (2001) und Lehtreck et al. (2002) etabliert. In beiden Arbeiten wurde zur Transformation ein Vektor eingesetzt, der die Ausbildung einer Haarnadelstruktur der exprimierten RNA ermöglichte. Diese Haarnadelstruktur der RNA wurde bereits zuvor als effektiver Initiator von RNAi beschrieben (Smith et al., 2000)

Ziele der Arbeit

“Knock-out“ Mutationen bestimmter Proteine ermöglichen in vielen Organismen die Analyse der Proteinfunktionen. In *Chlamydomonas reinhardtii* wird angenommen, dass ein “knock-out“ des Centringens letal ist (Dutcher, 2003). Eine Analyse der Centrinfunktionen wurde bisher nur über die Mutante vfl2 ermöglicht, welche eine Punktmutation im Centringen trägt (Taillon et al., 1992). Da diese Mutation eventuell nicht alle Funktionen des Proteins gleichermaßen beeinflusst (vgl. Diskussion), wurde in dieser Arbeit ein System entwickelt, welches die Verringerung der Centrinexpression über eine Induktion von RNAi in den Zellen arrangiert. Dieser Ansatz ermöglichte die Isolierung von mehreren Klonkolonien, die eine unterschiedliche Menge an Centrin weiterhin exprimierten. Diese Kolonien, sowie die Entwicklung eines induzierbaren Centrin-RNAi-Systems ließen Untersuchungen zur Sensitivität der unterschiedlichen Funktionen Centrins gegenüber der verminderten Centrinmenge zu.

Da sich der RNAi-Effekt in den Zellen als nicht stabil erwies, wurden im zweiten Teil dieser Arbeit Versuche durchgeführt, die Einblicke in diesen Inaktivierungsmechanismus in *Chlamydomonas reinhardtii* ermöglichen sollten.

II. Material und Methoden

1. Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern es in den entsprechenden Abschnitten nicht anders vermerkt ist, von den Firmen Roth, Merck, ICN, Serva oder AppliChem bezogen.

Die Bezugsquellen der Enzyme werden in den entsprechenden Abschnitten angegeben.

2. Algenstämme und Kulturbedingungen

2.1 Algenstämme

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Transformationen wurde der *Chlamydomonas reinhardtii* Stamm CC-3395 (arg7-8 cwd mt-) als Ausgangsstamm genutzt (Chlamydomonas Genetic Center, Duke University, Durham, NC). Als Kontrollstamm wurde dieser Stamm mit dem *arg7*-Gen transformiert.

Für die Einzelzellanalysen wurde der *Chlamydomonas reinhardtii* Stamm pf15 ("paralyzed flagella 15") eingesetzt (Brokaw und Luck, 1985). Dieser Stamm trägt eine Punktmutation im Kataningen und bildet keine zentralen Mikrotubulipaare in den Geißeln mehr aus (Smith and Lefebvre, 1997).

2.2 Kulturbedingungen der Algen

Die Arbeiten mit den Algenkulturen erfolgten immer unter sterilen Bedingungen. Die Stammkulturen wurden in nicht belüfteten 100 ml Erlenmeyerkolben, in ca. 50 ml TAP-Medium, kultiviert. Als Lichtquelle dienten Leuchtstoffröhren des Typs "universal white" (Osram, L 58 W/25) und „Biolux“ (Osram , L58 W/72-965) im Verhältnis 1:1. Der Belichtungszyklus war auf 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkel eingestellt. Die Temperatur betrug $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Die Kultivierung des Nit/RNAi-Stammes in ammoniumfreiem Medium erfolgte z.T. unter Dauerlicht bei $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

2.3 Kulturbedingungen der Algen zur Analyse der Mitosestadien

Die für die Präparation der Mitosestadien eingesetzten Stämme wurden über einen Zeitraum von 2-3 Wochen alle 3-4 Tage in frisches TAP-Medium umgesetzt, damit sich die Zellen im Teilungsstadium befanden.

2.4 Kulturbedingungen der Algen zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Inaktivierung des Konstruktes

Die Konzentration dieser Stämme wurde alle 7-10 Tage bestimmt und die Stämme auf 20.000 Zellen pro ml, in 50 ml TAP-Medium verdünnt. Die Zellen wurden zur Bestimmung der Zellzahl in Lugol'scher-Lösung fixiert.

Lugol'sche Lösung: 2 g KJ; 1 g J₂ in 100 ml Aqua dest.

2.5 Induktion des Nit/RNAi-Stammes durch eine Änderung der Kulturbedingungen

Die Induktion des Nit/RNAi-Vektors fand durch die Kultivierung des Stammes in ammoniumfreiem Medium (TAP_{KNO₃}) statt. Hierfür wurde 10-20 ml der Stammkultur (in TAP_{NH₄Cl}) in sterilen Gefäßen pelletiert (2000 rpm; 2-3 Minuten; Hettich/Rotixa/K), in 30 ml TAP_{KNO₃} resuspendiert und erneut pelletiert (s.o.). Dieser Waschschrift wurde mindestens zweimal wiederholt. Die so gewaschenen Zellen wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben, mit ca. 50 ml TAP_{KNO₃} inokuliert.

2.6 Algenkulturmedium

Die Kultivierungen der Algen fanden in Tris-Acetat-Phosphat-Medium (TAP; Gorman und Levine, 1965) statt.

	Einwaage in Gramm pro Liter Stammlösung	Stammlösung pro Liter Medium
NH ₄ Cl	40	10 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10	10 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5	10 ml

K ₂ HPO ₄	10,8	10 ml
KH ₂ HPO ₄	5,6	10 ml
Tris	121	20 ml
Essigsäure		1 ml
Na ₂ EDTA (Titriplex III)	50	1 ml
FeSO ₄	4,99	1 ml
KOH	16	1 ml
H ₃ BO ₃	11,4	1 ml
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	22	1 ml
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	5,06	1 ml
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,61	1 ml
CuSO ₄ x H ₂ O	1,57	1 ml
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 7 H ₂ O	1,1	1 ml

Der pH-Wert des Mediums wurde mit Essigsäure auf 7,0 eingestellt.

Zur Kultivierung der Stämme auf festem Medium wurden 15g Agar pro Liter Medium zugesetzt. Sofern Nitrat als einzige Stickstoffquelle im Medium vorliegen sollte, wurde NH₄Cl durch 8 ml 1M KNO₃ ersetzt. Zur Kultivierung der argininbedürftigen Stämme erfolgte der Zusatz von 0,02% L-Arginin Hydrochlorid (Endkonzentration; steril filtriert) nach dem Autoklavieren des Mediums.

3. Molekularbiologische Methoden

3.1 Grundlegende molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders vermerkt oder in diesem Abschnitt beschrieben, wurden grundlegende molekularbiologische Methoden in dieser Arbeit nach Standardprotokollen (Ausubel et al., 1995) und Herstellerangaben durchgeführt. DNA-Modifikationen, wie z.B. enzymatische Restriktionen oder Ligationen, werden hier nicht weiter aufgeführt. Die Reinigung von PCR-Produkten und die Elution von DNA aus Agarosegelen etc. wurde mittels "Kits" (Quiagen) durchgeführt und wird demnach hier nicht weiter beschrieben.

3.2 Vektoren, *Escherichia coli*-Stämme, Anzucht und Lagerung

In dieser Arbeit wurden die Vektoren pCrGFP (Fuhrmann et al., 1999) und pCB740 (Schroda et al., 2000) für die Klonierungen verwendet. Kotransformationen wurden mit dem Vektor pMS171 (Schroda) durchgeführt. Dieser Vektor enthält das *ble*-Gen (Stevens et al., 1996) unter der Kontrolle des HSP70/*rbcS2*-Fusionspromotors und die RBCL-3'UTR. Für die Klonierung eines, zur Kotransformation geeigneten RNAi-induzierenden Konstruktes, wurde der Vektor pNCrGFP (Dr. K.-F. Lehtreck; siehe Anhang) eingesetzt.

Für die Klonierungsschritte und Plasmidpräparationen diente der *E. coli*-Stamm DH5 α (Life Technologies). Die Transformation dieses Stammes wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Anzucht und Lagerung der Bakterien erfolgte unter Standardbedingungen. Falls erforderlich wurde dem Medium Ampicillin (10 mM) zugesetzt.

3.3 Aufarbeitung, Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

3.3.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Zur Plasmidpräparation aus *E. coli* wurde das Kit "GFXTMMicro Plasmid prep Kit" (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution der DNA fand in destilliertem Wasser bzw. EB-Puffer statt. Die Isolierung größerer Mengen DNA aus 25 ml Bakterienkultur wurde mittels des "Plasmid midi Kit" der Firma Qiagen durchgeführt und die DNA in 75 μ l EB-Puffer eluiert.

EB-Puffer: 10 mM Tris-HCl; pH 8,5

3.3.2 Präparation von genomischer DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Präparation von genomischer DNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* - ausgehend von 50 bis 150 ml Algen - wurde mittels "Plant DNAzol® Reagent" (Invitrogen, life technologies) durchgeführt. Das Pellet wurde in 50 bis 100 μ l EB-Puffer gelöst.

3.3.3 Präparation von RNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Isolierung von RNA aus *Chlamydomonas reinhardtii*, die modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt wurde, basiert auf der Verwendung chaotroper Salze, wie Guanidiniumthiocyanat. Dies führt zur Denaturierung der vorkommenden Proteine und somit auch zur Deaktivierung der RNasen. Alle Lösungen zur Präparation und Reinigung der RNA wurden aus demselben Grund, vor Gebrauch, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt.

Die Extraktion der RNA, ausgehend von ca. 25 ml Algenkultur, fand durch die Zugabe von "RNase-all"-Arbeitslösung statt. Hierzu wurden die Zellen bei 2000 rpm zentrifugiert (2-3 Minuten, Heraeus Labofuge 1) und in der Lösung resuspendiert. Die Zugabe von 0,3 ml CI zu 1,7 ml Extrakt diente der Fällung der Proteine aus dem Homogenisat. Das Extrakt wurde 2-3 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchmischt und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zusätzlich hierzu wurde der, nach einer Zentrifugation (12000 rpm, 10 Minuten, Sigma 2K15) gewonnene Überstand, mit 0,6 ml Phenol und 0,4 ml Chloroform versetzt, um die vollständige Entfernung der Proteine zu garantieren. Aus dem so gereinigten Überstand (nach einer weiteren Zentrifugation, siehe oben) konnte im Folgenden die RNA präzipitiert werden. Dies wurde durch drei aufeinander folgende Fällungen bewerkstelligt. Die 1. Fällung fand durch die Zugabe von 0,7 Volumen 100%igem Ethanol und 1/20 Volumen 1N Essigsäure für 30 Minuten auf Eis statt. Das nach einer Zentrifugation (14.000 rpm, 10 Minuten, Sigma 2K15) entstandene Pellet wurde zur 2. Fällung in ca. 0,5 ml 3M Natriumacetat (pH 6,0) aufgenommen und unter Schütteln resuspendiert (anschließende Zentrifugation bei 14.000 rpm für 15 Minuten, s.o.). Vor der 3. Fällung wurde das Präzipitat zweimal in 80%igem Ethanol gewaschen und durch kurzes Zentrifugieren in der Tischzentrifuge (Beckmann, Microfuge ETM) erneut pelletiert. Das an der Luft getrocknete Pellet wurde in 500 µl H₂O DEPC aufgenommen und mit 550 µl 5M Lithiumchlorid versetzt. Diese 3. Fällung fand über Nacht bei 4°C statt. Nach erneutem Waschen (in 80%igen Ethanol, siehe oben) wurde die RNA in 50 µl H₂O DEPC aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

RNase-all: 50% (w/v) Guanidinthiocyanat

0,5% Natrium-N-Laurylsarcosin

25mM NaOAc (ausgehend von einer 3M Stammlösung, pH 5,2)

0,7 Vol% β -Mercaptoethanol

pH 7,0 (der pH wurde vor Zugabe des β -Mercaptoethanol mit NaOH eingestellt)

RNase-all-Arbeitslösung: RNase-all:Phenol 1:1

Cl: Chloroform:Isoamylalkohol 24:1

H₂O DEPC: 0,1% Diethylpyrocarbonat (die Lösung wurde über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert)

3.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der präparierten Nukleinsäuren wurde durch Absorptionsmessung in einem Spektralphotometer (Eppendorf Biophotometer) bestimmt. Die Messung fand bei einer Wellenlänge von 200 bis 320 nm statt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht - im Falle von DNA - einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Bei RNA entspricht dies einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Der Quotient der Messwerte bei 260 und 280 nm sollte bei einer reinen Präparation zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.4 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

3.4.1 DNA-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Analyse der DNA wurden 1-2%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE Puffer aufgekocht, mit einer Endkonzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid versehen und in einen Gelträger gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versehen und aufgetragen. Die Elektrophorese fand bei 80V für 1 Stunde statt. Als Laufpuffer diente 1xTAE.

Die für den Southern-Transfer verwendeten Agarosegele liefen bei 40V über Nacht. Die Färbung der Gele wurde hier nach Abschluss der Elektrophorese durchgeführt.

20xTAE-Puffer: 0,8M Tris; 2,3% (v/v) Essigsäure; 40 mM EDTA; pH 8,5

10xProbenpuffer: 0,3% (w/v) Bromphenolblau; 30% (v/v) Glycin in TAE-Puffer

3.4.2 RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA fand modifiziert nach Lehrach et al. (1977), unter Verwendung von denaturierenden Agenzien, statt. Für die hier verwendeten 1-2%igen Agarosegele wurde die Agarose in Aqua dest. aufgekocht, nach dem Abkühlen mit 10x RB und Formaldehyd versetzt und in einen Gelträger gegossen. 25 µg Gesamt-RNA wurden mit Probenpuffer versehen, 15 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nachdem die Proben auf das Gel aufgetragen worden waren, liefen sie bei 115 V in das Gel ein. Die folgende elektrophoretische Auftrennung fand bei 130 V für 1 1/2 Stunden statt.

10xRB: 0,2M Mops; 0,05M NaAcetat; 0,01M EDTA; pH 7,0 mit 10N NaOH

Probenpuffer pro Ansatz: 20 µl Formamid

6 µl Formaldehyd

5 µl 10xRB

1 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml)

Zusammensetzung des Agarosegels (1%):

1% Agarose; 12 ml 10xRB; 8 ml Formaldehyd

ad 120 ml

3.5 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

3.5.1 Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southernblot)

Die Vorbehandlung des Agarosegels sowie der Transfer der DNA auf die Membran (Pall Biotex B 0,45 µm; Firma Gelman), wurde nach dem "downward capillary system" (Ausubel et al., 1995) durchgeführt. Der Transfer fand für mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur statt. Als Transferpuffer diente 20xSSC. Anschließend wurde die DNA durch UV-Licht (UV-Stratalinker; Stratagene) und halbstündiges Backen bei 80°C auf der Membran fixiert.

20xSSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0

3.5.2 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northernblot)

Die RNA wurde, laut Protokoll des "downward capillary system" in Ausubel et al. (1995), auf die Nylonmembran (Pall Biotex B 0,45 µm; Firma Gelman) transferiert.

Eine Vorbehandlung des Gels war nicht nötig. Der Transfer fand für mindestens 6 Stunden bei Raumtemperatur statt. Als Transferpuffer wurde hier 10x SSC verwendet. Die Fixierung der RNA auf der Membran wurde, wie für den Southerntransfer (siehe 3.5.1) beschrieben, durchgeführt.

3.6 Markierung von DNA-Sonden

3.6.1 Nicht-radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur nicht-radioaktiven Markierung von DNA basiert auf einer chemischen Reaktion, die zur Anheftung des Alkaloids Digoxigenin an die Basen der Sonde führt. Hierfür wurde das "DIG-Chem-Link Labeling und Detection Set" der Firma Roche verwendet. Die Markierung der DNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die so markierte DNA konnte bei -20°C gelagert werden.

3.6.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA basiert auf einer als "random priming" beschriebenen Reaktion, die durch das Klenow-Enzym katalysiert wird. 250ng DNA wurden hierzu mit 10 μl Oligomarkierungspuffer und 2 μl BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt und das Volumen auf 43 μl aufgefüllt. Nachdem der Ansatz für 5 Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend im Eis gekühlt wurde, konnten 40 μCi (^{32}P) dATP (ICN, Aurora/ USA) und 2 μl Klenow-Fragment (Boehringer, Mannheim; 2U/ μl) zugegeben werden. Die katalytische Reaktion fand für 1 1/2 Stunden bei 37°C statt. Die Reinigung der so markierten Sonde fand über eine Säulenmatrix (S200 *spin columns*; Pharmacia, Freiburg) statt.

Oligomarkierungspuffer: Der Puffer wurde aus drei getrennt angesetzten Lösungen (A,B,C) im Verhältnis 1:2,5:1 hergestellt.

Lösung A: 1,25 M Tris/HCl pH 8,2; 125 mM MgCl_2 ; 2 Vol% β -Mercaptoethanol; je 0,5 mM dNTPs

Lösung B: 2 M Hepes/NaOH; pH 6,6

Lösung C: 3,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Desoxyhexanukleotide (Boehringer, Mannheim)

Die Lagerung der Lösungen und des Oligomarkierungspuffer erfolgte bei -20°C .

3.7 Hybridisierung der Membranen mit den markierten DNA-Sonden

3.7.1 Hybridisierung von Northernblots mit markierten Sonden

Northernblots wurden in dieser Arbeit mit radioaktiv markierten DNA-Sonden inkubiert. Sowohl die Vorhybridisierung, wie auch die folgende Hybridisierung wurde in Röhren in einem Hybridisierungssofen durchgeführt. Die Membran wurde zuerst mit 2x SSC angefeuchtet und darauf folgend für 1 1/2 Stunden mit Church-Puffer bei 68°C vorhybridisiert. Zur Hybridisierung wurden 250 ng, der zuvor für 10 Minuten auf 95°C erhitzten Sonde, mit 3 ml vorgewärmten Church-Puffer vermischt und zu der Membran in die Röhre gegeben. Die Hybridisierung fand bei 58°C über Nacht statt.

An die Hybridisierung schlossen sich folgende Waschschrte an:

6x SSC 0,5% SDS 5 Minuten bei Raumtemperatur

4x SSC 0,5% SDS 5 Minuten bei Raumtemperatur

2x SSC 0,5% SDS 5 Minuten bei Raumtemperatur

2x SSC 0,5% SDS 15 Minuten 65°C

Der Blot wurde anschließend über einen PhosphorImager (Storm) ausgewertet.

Church-Puffer: 1 mM EDTA, 0,5 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$ (pH 7,2); 7% (v/v) SDS

3.7.2 Hybridisierung der Southernblots mit markierten Sonden

Die Southernblots dieser Arbeit wurden mit nicht-radioaktiv-markierten Sonden inkubiert. Der Blot wurde sowohl für die Vorhybridisierung, wie auch für die Hybridisierung, in Plastikfolie eingeschweißt und im Wasserbad inkubiert. Die Vorhybridisierung in Church-Puffer fand für mindestens 45 Minuten bei 68°C statt. Zur Hybridisierung wurden 20-50 ng Sonde pro ml Church-Puffer eingesetzt. Die Sonde war zuvor bei 95°C 10 Minuten erhitzt worden. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 65°C im Wasserbad statt. Die folgenden Waschschrte entsprachen denen der Northernhybridisierung (siehe 3.7.1).

Die immunologische Detektion wurde nach Anleitung der Firma Boehringer (Roche) durchgeführt. Sie basiert auf einer enzymatisch-gekoppelten Antikörperreaktion, die - nach Zugabe von kolorimetrischen Substraten (NBT und BCIP) - zu der Bildung eines violetten Farbkomplexes führt. Die hierfür verwendeten Puffer wurden

entweder nach Herstellerangaben ("The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation"; Boehringer Roche) oder nach Standardprotokollen (Ausubel et al., 1995) angesetzt.

3.8 Klonierung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren

3.8.1 Amplifizierung der DNA durch PCR ("polymerase chain reaction")

Die für die Konstruktion des Hybridkonstruktes benötigten Fragmente wurden mit den beiden Primerpaaren Censensefor/Censenserev bzw. Cenantisensefor/Cenantisenserev (siehe Anhang) amplifiziert. 25 µl Gesamtvolumen enthielten 5 ng genomische DNA, 1x PCR-Puffer, 3 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM dNTPs und je 1 µM Primer. Unmittelbar vor Reaktionsstart wurde 0,3 µl Taq-Polymerase (5 U/µl, von der Firma "Genecraft") zugesetzt. Die gewählten Reaktionsparameter sind im Folgenden aufgelistet:

Anfangsdenaturierung	98°C, 3 Minuten	
30 Zyklen à	95°C, 1 Minute	Denaturierung
	60°C, 1 Minute	Primer-Bindung
	72°C, 2 Minuten	Synthese
Extension	72°C, 10 Minuten	

Die Reaktionen wurden bei 4°C gelagert. Längere Lagerungen erfolgten bei -20°C.

Die Amplifikation des Nitratpromotors wurde mit den Primerpaar Nitfor/Nitrev (siehe Anhang) durchgeführt. Die Bindungstemperatur wurde auf 65°C erhöht. Die Zusammensetzung der Reaktion sowie die weiteren Reaktionsparameter blieben unverändert. Die PCR Produkte wurden mittels des "PCR Purification Kit" (Quiagen) gereinigt.

Die Sequenzen der Oligonukleotidprimer sind im Anhang angegeben.

3.8.2 Klonierung der PCR-Produkte in den Vektor pCrGFP

3.8.2.1 Klonierung des Hybridkonstruktes in den Vektor pCrGFP

Der Vektor pCrGFP (Fuhrmann et al., 1999) wurde mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *BamHI* verdaut. Das resultierende Vektorfragment (ohne GFP-Gen) wurde über ein Agarosegel gereinigt und isoliert ("Gel extraction Kit", Quiagen).

Die zur Amplifizierung der Centrinfragmente verwendeten Oligonukleotide (siehe 3.8.1) wurden komplementär zu Teilen des Centringens gewählt und mit den für die Klonierung benötigten Schnittstellen versehen. Das so entstandenen längere PCR-Produkt (223 bp; Censensefor/Censenserev) begann am Startkodon, beinhaltete das erste Exon und Intron und endete an der Intron/Exon Grenze zum zweiten Exon des Centringens. Es wurde von den Schnittstellen *XbaI* am 5'Ende und *HindIII* am 3'Ende begrenzt. Das kürzere PCR-Produkt (106 bp; Cenantisensefor/Cenantisenserev) begann am Startkodon und beinhaltete das erste Exon. Es endete an der ersten Exon/Intron Grenze des Gens. Am 5'Ende dieses Fragmentes befand sich eine *BamHI*-Schnittstelle. Das 3'Ende war mit einer *HindIII*-Schnittstelle versehen. Nach einem Doppelrestriktionsverdau konnten die Fragmente in den pCrGFP-Vektor ligiert (T4-Ligase der Firma USB) werden. Hierbei wurden die beiden Fragmente über die *HindIII*-Schnittstelle verbunden, was dazu führte, dass das kürzere Fragment in umgekehrter Orientierung zum Längeren ausgerichtet wurde. Das Endprodukt (RNAi/pCrGFP) wies eine Größe von ca. 3400 bp auf und diente als Ausgangsprodukt der unter 3.8.3 beschriebenen Klonierung.

3.8.2.2 Klonierung des Nitratreduktase-Promotors in den Vektor pCrGFP

Für die Amplifizierung des Nitratreduktase-Promotors wurde genomische DNA verwendet. Der Primer Nitfor wurde entsprechend der Anfangssequenz des Promotors zur Regulation des Nitratreduktasegens (Nit1) gewählt. Er wurde darüber hinaus mit einer *HindIII*-Schnittstelle zu Beginn der Sequenz versehen. Der Primer Nitrev wurde komplementär zu der Endsequenz des Nitratreduktase-Promotors gewählt und beinhaltete zusätzlich eine *PstI*-Schnittstelle. Das ca. 1000 bp große PCR-Produkt konnte so nach einem Doppelrestriktionsverdau in den ebenfalls mit *HindIII/PstI* verdauten pCrGFP ligiert (T4 Ligase der Firma USB) werden. Dieses so entstandene Produkt (Nit/pCrGFP) diente wiederum als Ausgangsvektor für die unter 3.8.2.1 beschriebene Klonierung.

3.8.3 Klonierung des Hybridkonstruktes in den Vektor pCB740

Der, wie unter 3.8.2.1 beschrieben, klonierte Vektor RNAi/pCrGFP wurde wiederum einem Doppelrestriktionsverdau mit den Enzymen *XbaI* und *EcoRI* unterzogen. Dies führte zu einem Fragment mit der Größe von ca. 480 bp, bestehend aus dem

Hybridkonstrukt der beiden Centrinfragmente und der Terminationssequenz der RubisCO. Dieses Fragment konnte nun, in den zuerst mit *Nhe/EcoRI* verdauten pCB740, ligiert werden, da es sich bei den Enzymen *Xba* und *NheI* um Isoschizomere handelt. Das Endprodukt RNAi/pCB740 wurde für die unter 3.9.1 beschriebenen Transformationen eingesetzt.

3.8.4 Klonierung des zur Kotransformation eingesetzten RNAi-induzierenden Vektors

Zur Kotransformation des RNAi-induzierenden Konstruktes mit dem Vektor pMS171 wurde eine verkleinerte Version des RNAi-induzierenden Vektors hergestellt. Beide Vektoren, die zur Kotransformation eingesetzt wurden, wiesen so in etwa die gleiche Größe auf.

Der HSP70A/rbcS2-Fusionspromotor wurde über einen *HindIII/NheI* Doppelrestriktionsverdau aus dem Vektor pNCrGFP (Dr. K.-F. Lehtreck) gewonnen. Das RNAi-induzierende Konstrukt konnte, nach einem Doppelrestriktionsverdau (*XbaI/BamHI*) des Vektors RNAi/pCrGFP, über ein Agarosegel eluiert werden. Beide Fragmente wurden in einem Schritt in den *HindIII/BamHI*-verdauten Vektor pCrGFP ligiert. Das Endprodukt dieser Klonierung wies eine Größe von ca. 3800 bp auf. Der so entstandene Vektor wurde für die unter 3.9.2 beschriebene Transformation eingesetzt.

3.9 Transformation von *Chlamydomonas reinhardtii*

3.9.1 Transformation des argininbedürftigen Stammes CC-3395

Zur Transformation von *Chlamydomonas reinhardtii* wurde in dieser Arbeit die von Kindle (1990) beschriebene "glass-bead" Methode verwendet. 5×10^7 Zellen wurden hier in Anwesenheit von 0,3-0,5 ml Glassperlen und 5% PEG8000 mit 1-2 µg linearisierter DNA (*EcoRI*) versehen. Der Ansatz wurde 45 Sekunden auf höchster Stufe geschüttelt (Vortex). Die Selektion der Transformanten fand auf festem Medium ohne Arginin statt. Die Kolonien wurden zur weiteren Charakterisierung in flüssiges Medium ohne Arginin überführt.

3.9.2 Kotransformation mit Vektor pMS171

Kotransformiert wurde in dieser Arbeit mit dem *KpnI*-linearisierten Vektor pMS171. Die transformierten Zellen wiesen so eine Zeozinresistenz auf und konnten über zeozinhaltiges festes Medium selektioniert werden. Der RNAi-induzierende Vektor (vgl. 3.8.4) wurde in einem 5- bis 10-fach erhöhten Verhältnis zum Vektor pMS171 eingesetzt. Transformiert wurde, wie unter 3.9.1 beschrieben. Unmittelbar nach der Transformation wurden die Zellen für 15 bis 17 Stunden in zeozinfreiem flüssigen TAP-Medium unter Dauerlicht geschüttelt, um die Resistenz auszubilden. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation angereichert (Hettich Rotixa/K; 2000rpm; 2-3 Minuten), in 0,5 ml TAP resuspendiert und auf festem zeozinhaltigen TAP-Medium plattiert.

4 Proteinbiochemische Methoden

4.1 Elektrophoretische Methoden

4.1.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde modifiziert nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die hier verwendeten Minigele hatten eine Trennstrecke von ca. 4,5 cm. Die Polymerisation der entgasten Trenngellösung fand für mindestens 2 Stunden, bei Raumtemperatur statt. Folgende Stammlösungen wurden verwendet:

Acrylamid: 29,22% Acrylamid4K, 0,78% Bisacrylamid 4K (AppliChem)

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,8% (w/v) SDS

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,8% (w/v) SDS

TEMED: 100%

Ammoniumpersulfat (APS): 10% (w/v)

Elektrodenpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS

Sofern nicht anders gekennzeichnet wurden in dieser Arbeit Gele eingesetzt, die eine 12,5%ige Konzentration an Acrylamid aufwiesen. Die Zusammensetzungen sind im Folgenden aufgelistet.

Dichtungsgel: 1,5 ml Acrylamid; 10 µl TEMED; 15 µl APS

12,5%iges Trenngel: 1,55 ml H₂O; 1,35 ml Puffer; 2,5 ml Acrylamid; 10 µl TEMED; 20 µl APS

Sammelgel: 1,95 ml H₂O; 0,95 ml Puffer; 0,65 ml Acrylamid; 10 µl TEMED; 20 µl APS

Die Elektrophorese fand bei konstanter Stromstärke von 25 mA/Gel in einer Elektrophoresekammer (Eigenbau der Werkstatt, Botanisches Institut) für ca. 1 Stunde statt.

Zur Vorbereitung der Proben, wurden diese in 4x Probenpuffer (1-fache Endkonzentration) aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Nach einer Zentrifugation (Beckmann, Microfuge ETM, 30 sec.) wurden die Proben aufgetragen.

SDS-Probenpuffer (4-fach konzentriert): 250 mM Tris-HCl pH 6,8; 4 mM EDTA; 8% (w/v) SDS; 40% (v/v) Glycerin; 2% (v/v) β- Mercaptoethanol; 0,2% Bromphenolblau

Zur Bestimmung der molekularen Masse der unbekannten Proteine wurden Proteinstandards verwendet.

MW-SDS-200 (Sigma): Myosin 205 kDa; β-Galaktosidase 116 kDa; Phosphorylase B 97,4 kDa; Rinderserumalbumin 66kDa; Ovalbulmin 45 kDa; Carboanhydrase 29 kDa
MWS-SDS-70L: Rinderserumalbumin 66 kDa; Ovalbumin 45 kDa; Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase 36 kDa; Carboanhydrase 29 kDa; Trypsinogen 24 kDa; Trypsininhibitor 20,1 kDa; α- Lactalbumin 14,2 kDa

4.1.2 Elektrotransfer der Proteine (Westernblot)

Für den Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Millipore; ImmobilonTM-P, Porengröße 0,45 µm) wurde in dieser Arbeit das „Tankblotverfahren“ (Towbin et al., 1979) verwendet. Die Membranen wurden unmittelbar vor Gebrauch 2 Minuten in Methanol aktiviert und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Das verwendete 3 MM Filterpapier stammte von der Firma Whatman. Der Transfer fand auf Eis, bei 80 V, für mindestens 1 1/2 Stunden statt. Als Transferpuffer wurde 1x konzentrierter Tankblotpuffer verwendet.

10x Tankblotpuffer: 72 g Glycin; 15g Tris

1x Tankblotpuffer (TB-Puffer): 10% 10xTankblotpuffer; 10% Methanol

Der Aufbau der Transfereinheit ist im Folgenden dargestellt:

Kathode

Vlies

2 Lagen Filterpapier getränkt in TB-Puffer

Trenngel

Transfermembran

2 Lagen Filterpapier getränkt in TB-Puffer

Vlies

Anode**4.2 Färbungen****4.2.1 Coomassiefärbungen der Polyacrylamidgele**

Polyacrylamidgele wurden für 1/2 Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend über Nacht entfärbt. Die Entfärbung fand ebenfalls unter Schütteln statt, wobei der Puffer mehrmals ausgetauscht wurde. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte in essigsaurem Aqua dest..

Färbelösung: 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,1% (w/v) Serva Blau G-250

Entfärbelösung: 10% (v/v) Methanol; 7% (v/v) Essigsäure

4.2.2 Ponceaufärbung, reversible Färbung von PVDF-Membranen

Die Membranen wurden 5 Minuten in der Färbelösung gefärbt und anschließend in Aqua dest. entfärbt.

Färbelösung: 0,2% (w/v) Ponceau S; 3% (v/v) Essigsäure

4.2.3 Amidoschwarzfärbung von PVDF-Membranen

Die Membran wurde für 3 Minuten in Amidoschwarzlösung gefärbt und anschließend für 10 Minuten in Entfärbelösung entfärbt. Die Lösung wurde mehrmals erneuert.

Färbelösung: 90% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,1% (w/v) Amidoschwarz 10 B

Entfärbelösung: 90% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

4.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte modifiziert nach der Methode von Neuhoff et al. (1979). Hierfür wurden 2 bzw. 5 µl der Probe in Probenpuffer gekocht und auf eine Celluloseacetatmembran (Sartorius SM) getropft und getrocknet. Die Färbung der Membran erfolgte für 5 Minuten in Amidoschwarzfärbelösung, die Entfärbung für 3x5 Minuten in Entfärbelösung. Nach dem Trocknen wurde die Membran in DMSO aufgelöst und die Absorption bei 630 nm im Spektralphotometer (Shimadzu UV 260) gemessen. Als Referenzwert diente ein identisches, in DMSO aufgelöstes, Membranstück ohne Proteinprobe. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration diente eine über Proteinstandards aufgestellte Eichgerade.

Bei einem abgewandelten Ansatz dieser Proteinbestimmung wurden die entfärbten Membranstücke direkt mit Proteinstandards verglichen, bei denen unter gleichen Bedingungen bekannte Konzentrationen an BSA aufgetropft und gefärbt worden waren.

5 Immunologische Methoden

5.1 Antikörper

Primäre Antikörper:

mAK BAS 6.8	(anti-Centrin; 1:20; Geimer et al., 1997)
pAK Cen1	(anti-Centrin; 1:4000; Salisbury et al., 1984)
pAK Cen2	(anti-Centrin aus <i>Spermatozopsis similis</i> ; 1:200)
mAK GT-335	(polyglutamyliertes Tubulin; 1:1200; Wolff et al., 1992)
mAK 6-11B1	(acetyliertes Tubulin; 1: 300; Sigma)
pAK anti- α -Tubulin	(1: 800; Silflow und Rosenbaum, 1981)

Sekundäre Antikörper:

anti-Kaninchen IgG Alkalische-Phosphatase-Konjugat	(Sigma; 1:4000)
anti-Kaninchen IgG FITC-Konjugat	(Sigma; 1:100)
anti-Kaninchen IgG Cy3-Konjugat	(Dianova; 1:300)
anti-Maus IgG FITC- Konjugat	(Sigma; 1:100)
anti-Maus IgG Cy3-Konjugat	(Dianova; 1:300)

Die Antikörper pAK Cen1 und anti-Kaninchen IgG Alkalische-Phosphatase-Konjugat wurden für Westernblots eingesetzt. Die weiteren Antikörper wurden für Immunfluoreszenzen verwendet. Die hier angegebenen Verdünnungen wurden in den entsprechenden Blockpuffern angesetzt.

Abkürzungen: mAK= monoklonaler Antikörper; pAK= polyklonaler Antikörper

5.2 Immunologischer Nachweis der Proteine des Westernblots

Zur immunologischen Analyse wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (vgl. 4.1). Die folgenden Schritte fanden bei Raumtemperatur und unter Schütteln statt. Die Membran wurde für 1,5 Stunden bzw. über Nacht bei 4°C in Blockierlösung abgesättigt, um unspezifische Interaktionen zwischen dem Antikörper und der Membran bzw. den Proteinen zu verhindern. Die Membran wurde folgend 3x für je 15 Minuten gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (pAK Cen1, 1:4000 in Blockierpuffer) fand für 1,5 Stunden statt. Nach einer Wiederholung der Waschschrte wurde der Blot 1 1/2 Stunden mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-IgG Alkalische Phosphatase-Konjugat, 1:4000 in Blockpuffer) inkubiert. Die Färbereaktion erfolgte nach erneutem Waschen durch den Zusatz der kolorimetrischen Substrate. Hierfür wurden je 50 µl der Stammlösungen NBT und BCIP pro 10 ml AP-Puffer eingesetzt. Die Membranen wurden solange in der Färbelösung inkubiert, bis die Färbung sichtbar war. Danach wurde die Reaktion mit essigsaurem Aqua dest. abgestoppt und die Membranen zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

TBS-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl

TBS-T-Puffer: TBS-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20

Blockierpuffer: TBS-T-Puffer mit 2% (w/v) Fischgelantine; 0,02% (v/v) NaN₃

Alkalischer Phosphatase-Puffer (AP-Puffer): 100 mM Tris/HCl, pH 8,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂

NBT: 75 mg/ml NBT (4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid) in 70% DMF

BCIP: 50 mg/ml BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat) in 100% DMF

5.3 Indirekte Immunfluoreszenz

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Fixierung der Zellen auf den Objektträgern verwendet; die Glutaraldehydfixierung zuvor lysierter Zellen und

die Methanolfixierung (siehe 5.3.1 bzw. 5.3.2). Für die Fluoreszenzpräparate wurden „Multiwellslides“ der Firma Roth eingesetzt, die vorher mit Poly-L-Lysin beschichtet und mit Aqua dest. gespült wurden. Die Inkubation der Proben mit Blockpuffer wurde mindestens 30 Minuten (alternativ über Nacht) durchgeführt. Die Inkubationen mit dem primären bzw. dem sekundären Antikörper erfolgten jeweils für 1 1/2 Stunden. Zwischen den beiden sowie nach der zweiten Antikörperinkubation wurden die Proben 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate getrocknet und mit Fluoreszenzstabilisator versehen. Nach der Versiegelung der Ansätze, durch ein mit Nagellack fixiertes Deckgläschen, wurden die „Multiwellslides“ im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

Für die Betrachtung der Präparate wurde ein 100er Ölimmersionsobjektiv des Fluoreszenzmikroskopes Nikon Eclipse E 800 verwendet. Die zur Verfügung stehende Digitalkamera (Diagnostics Model 2.1.1) stammte von der Firma Instruments Inc.. Die weitere Auswertung der Fluoreszenzbilder geschah computergestützt mit den Programmen Metamorph 4.5 r 4 und Adobe Photoshop 6.0 bzw. Adobe Illustrator 9.0 (Adobe, Mountain View, Kalifornien, USA).

Poly-L-Lysin: 0,1% Poly-L-Lysin in Aqua dest.

Na-PBS: 1,5 mM NaH₂PO₄; 8,1 mM Na₂HPO₄; 150 mM NaCl; pH 7,4

Blockpuffer: PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20; 0,4 % (w/v) BSA; 1 % Fischgelantine; pH 7,5

Fluoreszenzstabilisator: Citifluor LTD, London, England

5.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz an isolierten Cytoskeletten

Die Aufkonzentrierung von etwa 10 ml Algen geschah durch eine Zentrifugation bei 650xg (Heraus Variofuge; 8 Minuten). Die entstandenen Pellets wurden in 100 bis 500 µl MT-Puffer resuspendiert. Bevor die Zellen auf den „Multiwellslides“ fixiert wurden, erfolgte eine Lyse der Zellen durch Zugabe des gleichen Volumens an Lysispuffer. Nach 45 Sekunden wurde das doppelte Anfangsvolumen an MT-Fix Puffer zugesetzt und die Ansätze für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem die isolierten Cytoskelette auf die Multiwellslides transferiert worden waren, erfolgte eine 20-minütige Inkubationszeit. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gespült und in Blockpuffer blockiert.

MT-Puffer: 30 mM HEPES; 15 mM KCl; 5 mM EGTA; 5 mM MgSO₄; pH 7,0

Lysispuffer: MT-Puffer mit 3% Triton

Fixierpuffer: MT-Puffer mit 6% Paraformaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd

5.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz an methanolfixierten Zellen

Die Zellen wurden, wie unter 5.3.1 beschrieben, konzentriert und in MT resuspendiert. Die Suspension wurde darauf folgend auf die "Multiwellslides" transferiert und für 3-5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf den Objektträger in Methanol bei -20°C für 7 Minuten fixiert und an der Luft getrocknet.

6. Bestimmung der durchschnittlichen Geißelzahl

Die durchschnittliche Geißelzahl der Zellen wurde in lugolfixierten Zellen bestimmt. Die Zählungen wurden an dem Mikroskop Olympus BH2 mit einem 40er Objektiv durchgeführt.

7. Präparation der Algen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung

Die Präparation der Algen zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurde freundlicherweise von Dr. Andrea Grunow und Dr. Karl-Ferdinand Lechtreck durchgeführt. Hierzu wurden ganze Zellen pelletiert und in 0,5 ml TAP resuspendiert. Die Fixierung erfolgte durch Zugabe von 0,7 ml TAP mit 5% Glutaraldehyd und 1% OsO_4 auf Eis für 30 Minuten. Die folgenden Schritte wurden, wie zuvor beschrieben, durchgeführt (Grunow und Lechtreck, 2001).

Die Elektronenmikroskopie der Präparate erfolgte an einem Transmissions-Elektronenmikroskop (TE CM 10) der Firma Philips. Zur Dokumentation diente eine Plattenkamera mit dem Format 65x90 mm).

8. FACS ("fluorescence associated cell sorter")

Die Messung und Sortierung der Zellen erfolgte aufgrund von Größe und Eigenfluoreszenz über ein Gerät der Firma Becton Dickinson (Institut für Genetik, Köln). Als Zellsortierer wurde ein FACStar+ Sorter mit einer 70 μm Düse verwendet. Analysiert wurden die Zellen über einen Argon-Neon Laser der Firma Spectra-Physics, bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Zellen wurden in eine 96er-

Zellkulturplatte (Falcon), in 50 µl TAP, sortiert und mittels eines Umkehrmikroskopes der Firma Olympus ausgewertet.

9. Computergestützte Auswertungen

9.1 Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen

Die Möglichkeit zur Bestimmung der durchschnittlichen Intensität eines konstanten Bereiches, in den Bildern der Immunfluoreszenz, ist eine Funktion des Softwareprogramms Metamorph 4.5 r 4. Es wurde ein definierter Bereich gewählt, der in etwa der Größe eines Basalkörpers entsprach. Die Messungen wurden mit den Hintergrundwerten der Fluoreszenzpräparationen abgeglichen.

9.2 T-Test (Signifikanztest)

Der hier verwendete T-Test ist Bestandteil des Softwareprogrammes Microsoft Excel (Office:mac 2001). Hier wurde ein T-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($P \leq 0,05$) durchgeführt. Die für diesen Test verwendeten Daten müssen der Normalverteilung entsprechen.

Auch die weiteren statistischen Auswertungen - sowie die Bestimmung von Standardabweichungen - wurden mit diesem Programm durchgeführt.

III. Ergebnisse

1. Klonierung und Transformation des RNAi-induzierenden Konstruktes

Centrin, ein ubiquitär verbreitetes Protein eukaryotischer Zellen, besitzt essentielle Funktionen in der Organisation des Cytoskeletts und des Zellzyklus. Darüber hinaus stellt Centrin eine strukturelle Komponente der mikrotubuliorganisierenden Zentren (MTOCs) eukaryotischer Zellen dar (Schiebel und Bornens, 1995). Im folgenden Teil dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer reduzierten Centrinmenge in den Zellen auf die Abläufe dieser Prozesse in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* untersucht. Da ein "knock-out" dieses Gens als letal beschrieben wurde (Dutcher, 2003), wurde hier zur Verringerung der Centrinexpression ein Vektor konzipiert, welcher einen als sog. "RNA interference" (RNAi) bezeichneten Mechanismus in den transformierten Zelllinien induziert (Fuhrmann et al. 2001; Lechtreck et al., 2002). Durch diesen Mechanismus wird ein Abbau der homologen mRNA eingeleitet, der dann in einer verminderten Proteinexpression resultiert.

Die beiden unterschiedlich langen Fragmente des Centringens zur Klonierung des Hybrid-Konstruktes wurden mittels PCR ("polymerase chain reaction") aus genomischer DNA von *Chlamydomonas reinhardtii* amplifiziert. Das längere Fragment (223 bp) beinhaltet das erste Exon und das erste Intron des Gens und wird von einer *XbaI*-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *HindIII*-Schnittstelle am 3'-Ende eingegrenzt (Abbildung 1). Das kürzere Fragment (106 bp) beinhaltet das erste Exon des Gens und weist eine *BamHI*-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *HindIII*-Schnittstelle am 3'-Ende auf (Abbildung 1). Durch einen Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen ermöglichte dies die Ligation der beiden Fragmente über die *HindIII*-Schnittstelle. Das kürzere Fragment ist dabei in umgekehrter Orientierung zum längeren Fragment ausgerichtet (Abbildung 1). Eingegrenzt wird das so entstandenen Konstrukt durch die *XbaI*-Schnittstelle am 5'-Ende und die *BamHI*-Schnittstelle am 3'-Ende, was somit die gerichtete Klonierung in die "multiple cloning site" (MCS) unmittelbar vor die Terminationssequenz des pCrGFP-Vektors (Fuhrmann et al., 1999) ermöglichte. Da es sich bei *XbaI* und *NheI* um Isoschizomere handelt, ermöglichte ein erneuter Verdau des pCrGFP/RNAi-Vektors mit den Enzymen *XbaI* und *EcoRI* die Ligation des aus dem Konstrukt und dem Terminator der RubisCo bestehenden Fragments in den *NheI/EcoRI* verdauten

Vektor pCB740 (Schroda et al., 2000). Somit konnte das Konstrukt unter die Kontrolle des HSP70A/rbcS2-Fusionspromotors gestellt werden. Eine Übersicht des Konstruktdesigns des RNAi-induzierenden Vektors pCB740/RNAi ist in Abbildung 1 dargestellt.

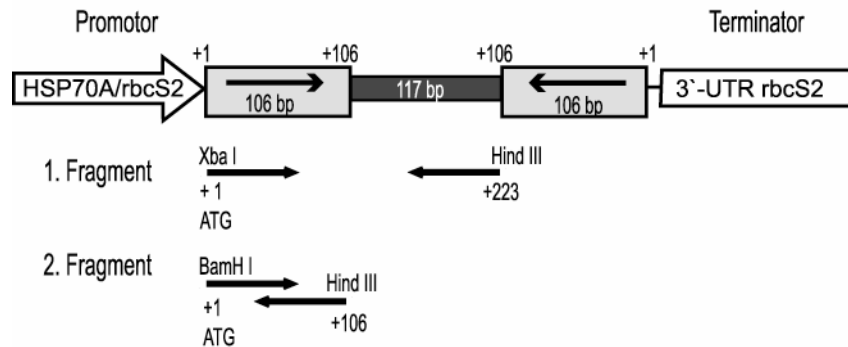


Abbildung 1: Design des RNAi-induzierenden Vektors pCB740/RNAi

Dargestellt ist das Konstrukt, das in dieser Arbeit verwendet wurde, um den RNAi-Mechanismus in den transformierten Zelllinien zu induzieren. Der hellgraue Kasten stellt das erste Exon des Centringens dar, der Pfeil gibt die Orientierung der Sequenz an. Das Intron zwischen den beiden komplementären Bereichen ist als dunkelgraues Rechteck abgebildet. Position und Schnittstellen der Primer sind angegeben. +1 bzw. ATG bezeichnet den Translationsstart des Centringens.

Der pCB740/RNAi-Vektor, der zur Transformation verwendet wurde, beinhaltet außer dem RNAi-induzierenden Konstrukt auch eine Kopie des Argininosuccinat-Lyase-Gens (*arg7*; Schroda et al., 2000). So wurde eine einfache Selektion der transformierten Zelllinien durch Komplementation der Mutation in dem Transformationsstamm (*Chlamydomonas reinhardtii* CC-3395; *arg*⁻, *cw*⁻) ermöglicht. Nach der Selektion der Transformanten auf festem argininfreiem Medium, wurden einzelne Klonkolonien in flüssiges TAP („Tris-Acetat-Phosphat“-Medium) überführt, um weiterführend charakterisiert zu werden. Die nachfolgende Selektion der Transformanten basierte auf makroskopischen Beobachtungen des Schwimmverhaltens, da die reduzierte Centrinmenge der Zellen mit dem Verlust der Schwimmfähigkeit korrelierte (siehe auch III.2). 26 von 58 Kolonien aus zwei unabhängigen Transformationen zeigten Fehler im Schwimmverhalten. Der Effekt des Konstruktes wurde in insgesamt sieben Transformationen bestätigt.

2. Einfluss des Centrinmangels auf die Anzahl der Geißeln und Basalkörper

Die Zelllinien mit verringertem Centringehalt wurden über Westernblot und anti-Centrin-gefärbte Immunfluoreszenzpräparationen charakterisiert (Abbildung 2A, B). Es zeigte sich, dass die restliche Centrinmenge zwischen den unterschiedlichen Klonkolonien variierte. Die drei hier exemplarisch dargestellten Stämme zeichneten sich durch eine restliche Centrinmenge von ca. 40% (I A7), 28% (I A10) und 5% (II N41) im Vergleich zu Wildtyp aus (Abbildung 2B). Die durchschnittliche Geißelzahl der Transformanten wurde in lugolfixierten Proben bestimmt, während die Immunfluoreszenzpräparationen zur Bestimmung der durchschnittlichen Anzahl an punktförmigen Centrinsignalen dienten (Tabelle 1). Da sich diese punktförmigen Centrinsignale an der Basis der Geißeln befanden, handelte es sich hier vermutlich um Basalkörper (vergleiche auch III.2.).

Es konnte gezeigt werden, dass die Verminderung der Centrinmenge in den Zellen zu einer Abnahme der durchschnittlichen Geißel- bzw. Basalkörperzahl führte (Tabelle 1; Abbildung 2A und E). II N41-Zellen besaßen durchschnittlich 0,33 Geißeln und 0,53 Basalkörper pro Zelle. In RNAi-Stämmen mit einem mildereren RNAi-Effekt, wie z.B. I A7, war die durchschnittliche Geißelzahl auf 1,86 und die durchschnittliche Basalkörperzahl auf 1,98 verringert. Eine Übersicht über die Geißel- bzw. Basalkörperzahlen der exemplarisch dargestellten RNAi-Stämme und des Wildtyps (Kontrolle) gibt Tabelle 1.

	Geißelzahl (%)							Basalkörperzahl (%)							
	0	1	2	3	4	Σ	n	0	1	2	3	4	5	Σ	n
Kontrolle	1,2	0,4	98,4	-	-	1,95	251	0,7	-	99,3	-	-	-	1,99	276
I A7	5,6	6,6	84,6	2,8	0,3	1,86	286	2	1,2	94,5	2	0,4	-	1,98	256
I A10	57,2	22	19,2	1,6	-	0,65	318	20,6	6,5	60,1	10,9	1,4	0,4	1,67	276
II N41	74,4	18,1	7,5	3	-	0,33	277	67,1	19,9	7,4	4,2	0,9	0,5	0,53	216

Tabelle 1: Übersicht über Geißel- bzw. Basalkörperzahlen in dem Kontrollstamm und den RNAi-Stämmen I A7, I A10 und II N41

Die Geißelzahlen wurden in lugolfixierten Proben, die Basalkörperzahlen in methanolfixierten und anti-Centrin-gefärbten (BAS mAK6.8) Zellen bestimmt.

Ø= durchschnittliche Geißel - bzw. Basalkörperzahl pro Zelle, n= Anzahl der ausgewerteten Zellen

In Wildtypzellen von *Chlamydomonas reinhardtii* ist Centrin Bestandteil von drei mit den Basalkörpern assoziierten Strukturen. Centrin kann in der distalen Verbindungsfibrille zwischen den Basalkörpern ("distal connecting fiber"; dCF) und in der sternförmigen Übergangsregion zwischen Basalkörper und Axonema ("stellate structure") nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist Centrin auch eine Komponente der Verbindung zwischen Kern und Basalkörper ("nucleus-basal body-connector"; NBBCs), die in einer den Kern umschließenden Faserstruktur ausläuft (Salisbury et al., 1988; siehe auch I. Einleitung).

Immunfluoreszenzuntersuchungen ergaben, dass diese Strukturen des Centrin-systems in den RNAi-Stämmen nicht mehr ausgebildet wurden (Abbildung 2A). In Stämmen, die einen milden RNAi-Effekt aufwiesen, konnten in einigen Zellen lediglich noch punktartige centrinhaltige Strukturen um den Kern nachgewiesen werden (<5%; z.B. I A7; Abbildung 2Ae). Diese repräsentierten vermutlich Reste des Kernfasersystems. In Stämmen mit einer geringen Centrinmenge (z.B. I A10 und II N41) fand eine Verringerung der Geißel- bzw. Basalkörperzahl (I A10; Abbildung 2A) statt. In dem Stamm II N41 und in vergleichbaren Stämmen kamen hauptsächlich unbegeißelte, basalkörperfreie Zellen vor (Abbildung 2A). In wenigen Zellen allerdings erhöhte sich die Anzahl der Geißeln (auf durchschnittlich 3-4 Geißeln pro Zelle) bzw. Basalkörper (auf durchschnittlich 3-7 Basalkörper pro Zelle). Abbildung 2C zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen einer II N41-Zelle mit sieben Basalkörpern.

Abbildung 2D zeigt das Ergebnis eines Southernblots, der zur Bestimmung der Anzahl, der im Genom integrierten Konstruktkopien an unterschiedlichen RNAi-Stämmen durchgeführt wurde. Die isolierte DNA der RNAi-Stämme wurde mit *Xba*I, einem Restriktionsenzym, das zu Beginn der Promotorsequenz schneidet, verdaut. Als Sonde für diesen Blot wurde das DIG-markierte *Hind*III/*Eco*RI-Fragment des pCrGFP/RNAi-Vektors verwendet. Dieses Fragment beinhaltet den kürzeren Arm des RNAi-induzierenden Konstruktes sowie die Terminationssequenz der RubisCO (vgl. Abbildung 1). Das Ergebnis zeigt, dass sowohl bei dem Stamm I A7, wie auch bei den Stämmen II N41 und VII E5 (Charakterisierung des Stammes siehe Tabelle 2) nur eine Kopie des Konstruktes in das Genom integriert wurde (Abbildung 2D). Die unterschiedliche Stärke des RNAi-Effektes in den einzelnen Stämmen war somit nicht auf die Anzahl an Konstruktkopien, sondern auf deren Position im Genom zurückzuführen.

Abbildung 2: Charakterisierung des Kontrollstammes und der RNAi-Stämme I A7, I A10 und II N41

A: Immunfluoreszenzaufnahmen der methanolfixierten und anti-Centrin-gefärbten Kontroll- (a) und Centrion-RNAi-Zellen (b-d)

e: Doppelfluoreszenz eines isolierten Kernes (I A7),

weiß: Centrinfärbung (mAK BAS 6.8; 1:20), schwarz: DAPI-Färbung

Der Maßstab entspricht 5 µm.

B: Westernblot des Kontrollstammes und der RNAi-Stämme I A7, I A10 und II N41

25 µg Gesamtprotein des Pellets der tritonlysierten Zellen wurde über eine 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

oben: Amidoschwarz-Färbung, unten: primärer Antikörper: pAK Cen1 1:4000

Die Markerbanden sind in kDa angegeben. Sie setzen sich aus den Größenstandards des "Low-Marker" (MWS-SDS-70L) und des "High Marker" (MWS-SDS-200) zusammen.

C: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer II N41-Zelle

Die Serienschritte zeigen die sieben Basalkörper dieser Zelle. Die Pfeile in der Abbildung kennzeichnen die Basalkörper. Die elektronenmikroskopischen Präparationen wurden von Dr. K.-F. Lehtreck durchgeführt

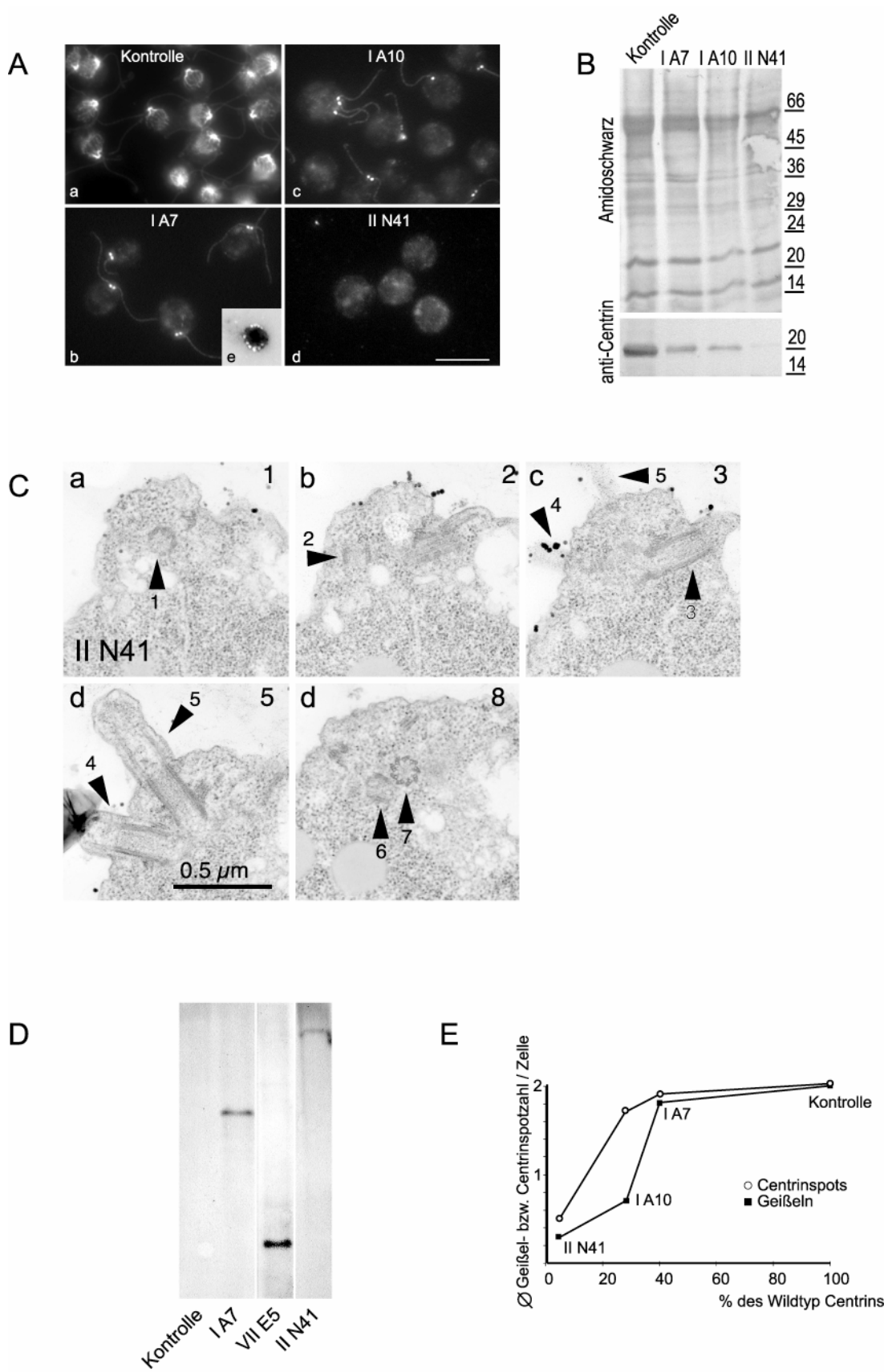
oben rechts: Schnittnummer

D: Southernblot des Kontrollstammes sowie der RNAi-Stämme I A7, II N41 und VII E5

25 µg DNA pro Spur wurden mit dem Restriktionsenzym *XbaI* verdaut, über ein 1,5%iges Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Als Sonde wurde das DIG-markierte *HindIII/EcoRI*-Fragment des pCrGFP/RNAi-Vektors verwendet.

E: Das Diagramm vergleicht die restliche Centrionmenge der Stämme (X-Achse) mit der durchschnittlichen Basalkörper- bzw. Geißelzahl (Y-Achse) der Zellen.

■: durchschnittliche Geißelzahl pro Zelle; ○: durchschnittliche Centrionspotzahl/Basalkörperzahl pro Zelle



Da sich der RNAi-Effekt in den transformierten Zelllinien als nicht stabil erwies (siehe auch III.10), wurden die Versuche dieser Arbeit an verschiedenen Stämmen aus mehreren Transformationen durchgeführt. Die verwendeten Stämme wurden auch während der Experimente immer wieder durch Geißel- bzw. Basalkörperzählungen auf die Stärke des RNAi-Effektes untersucht. Eine Übersicht über die Geißel- und Basalkörperzahlen aller in dieser Arbeit verwendeten pCB740/RNAi- Stämme gibt die folgende Tabelle.

	Geißelzahl (%)							Basalkörperzahl (%)							
	0	1	2	3	4	Σ	n	0	1	2	3	4	5	Σ	n
Kontrolle	1,2	0,4	98,4	-	-	1,95	251	0,7	-	99,3	-	-	-	1,99	276
I A7	5,6	6,6	84,6	2,8	0,3	1,86	286	2	1,2	94,5	2	0,4	-	1,98	256
I A10	57,2	22	19,2	1,6	-	0,65	318	20,6	6,5	60,1	10,9	1,4	0,4	1,67	276
II N41	74,4	18,1	7,5	3	-	0,33	277	67,1	19,9	7,4	4,2	0,9	0,5	0,53	216
IV F11	9,9	8,9	79,7	1	0,5	1,73	202	5,1	2,3	80,7	5,1	2,8	-	2,05	176
IV G10	31	11	58	-	-	1,2	200	8,3	8,3	81,8	1,5	-	-	1,74	132
V G4	95,4	4,1	0,5	-	-	0,1	217	67,2	12,4	14,4	1,5	2	-	0,54	201
V G6	98	1,5	0,5	-	-	0,02	204	57,8	6,7	26,9	4,9	2,7	0,9	0,9	223
V H8	37,6	2,3	59,7	0,5	-	1,23	221	4	0,4	93,3	2,2	-	-	1,94	225
V H9	18,8	3,75	77,5	-	-	1,59	80	5,1	0,4	89,4	4,7	0,4	-	1,93	235
VI E5	83,9	6,8	9,3	-	-	0,25	205	68,6	11,7	14,9	4,2	0,5	-	0,56	188
VII G4	98,2	1,8	-	-	-	0,02	114	65,7	7,3	14,6	7,3	5,1	-	0,78	137

Tabelle 2: Übersicht über die pCB740/RNAi-Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Die Geißelzählungen wurden in lugolfixierten Proben, die Basalkörperzählungen in centringefärbten (BAS mAK 6.8, 1:20) Immunfluoreszenzpräparaten durchgeführt.

Ø= durchschnittliche Geißel- bzw. Basalkörperzahl pro Zelle; n= Anzahl der Zellen

3. Einfluss der verminderten Centrinmenge der Zellen auf die Struktur der Basalkörper und der assoziierten Geißeln

Da in den RNAi-Stämmen eine Diskrepanz zwischen Geißel- und Basalkörperzahl nachgewiesen wurde (Tabelle 1; Abbildung 2E), wurden Doppelimmunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen Centrin und α -Tubulin (Abbildung 3A) durchgeführt, um die Existenz unbegeißelter Basalkörper zu überprüfen. Fluoreszenzen mit Antikörpern gegen weitere Proteine der Basalkörper sollten diese Ergebnisse bestätigen. Als solche Basalkörpermarker wurden GT335, ein Antikörper gegen polyglutamyliertes Tubulin (Abbildung 3B) und 6-11B1, ein Antikörper gegen acetyliertes Tubulin, (Abbildung 3B) gewählt. Beide Proteinmodifikationen sind in den Basalkörpern angereichert (Lechtreck und Geimer, 2000; siehe auch III.6).

Das Ergebnis der Fluoreszenzen bestätigte das Vorkommen unbegeißelter Basalkörper (siehe Pfeile in Abbildung 3Bc-e). Die Kolo-kalisation von Centrin und polyglutamyliertem Tubulin bestätigte darüber hinaus die Annahme, dass die punktförmigen Centrinsignale Basalkörper repräsentierten (Abbildung 3Ba,b). In einigen Zellen konnten zusätzlich centrinfreie Basalkörper durch den Basalkörpermarker GT335 detektiert werden (5% der GT335 Signale in II N41 zeigten ein sehr schwaches bzw. kein Centrinsignal, vgl. III.6). Diese Beobachtungen wurden bestätigt durch elektronenmikroskopische Untersuchungen des Stammes II N41. Viele der Basalkörper in II N41 hatten keine oder nur sehr kurze Geißeln ($\leq 1 \mu\text{m}$; Abbildung 3Db-e). Es kam des weiteren zu Fehlbildungen im Aufbau der Geißeln, Fehllokalisationen der Basalkörper und zur Einlagerung von elektronendichtem Material (Abbildung 3D). Die Übergangsregion, die in Wildtypzellen in longitudinalen Schnitten als H-förmige Struktur erkennbar ist (zusammenfassend: Melkonian et al., 1992; schwarzer Pfeil in Abbildung 3Da), war in allen II N41-Zellen defekt (Pfeil in Abbildung 3Db). In quergeschnittenen Basalkörpern war zu erkennen, dass der für diese Struktur charakteristische sternförmige Aufbau (Abbildung 3Ca) in den II N41-Zellen fehlte. Das zentrale Mikrotubulipaar, welches in Wildtypzellen auf die Geißel beschränkt bleibt, war hier in den Basalkörpern nachweisbar. Abbildung 3Dc-e zeigt einige Beispiele für nicht korrekt lokalisierte Basalkörper. So waren die Basalkörper teilweise falsch an die Plasmamembran geheftet (Abbildung 3Dc und d) bzw. lagen in cytoplasmatischen Bereichen ohne Kontakt zur Membran (Abbildung 3De) vor.

Abbildung 3: Auswirkungen des Centrinmangels auf die Basalkörperzahl und die Fähigkeit zur Geißelgenerierung

A: Immunfluoreszenzaufnahmen tritonlysierter Zellen der RNAi-Stämme I A7 (a) und I A10 (b-d)
a-d: anti-Centrin-Färbung (mAK BAS 6.8; 1:20); a', b', c' und d': korrespondierende anti- α -Tubulin-Färbung (1:800) der Zellen

Die I A10-Zellen wiesen zusätzliche unbegeißelte Basalkörper auf.

Maßstab: 5 μ m

B: Immunfluoreszenzaufnahmen tritonlysierter I A7- (a), I A10- (b,c) und II N41-Zellen (d,e)
a und b: anti-Centrin-Färbung (pAK Cen2; 1:200), a', b' sowie c und d: GT335-gefärbte (1:1200) Zellen, e: 6-11B1-Färbung (1:300) der II N41-Zellen, a', b' korrespondierende Aufnahmen zu a und b
Die Pfeilspitzen in den Abbildungen kennzeichnen zusätzliche unbegeißelte Basalkörper in den Zellen.

Maßstab in b für a, b, a' und b', Maßstab in d für c und d;

Alle Maßstäbe entsprechen 5 μ m.

C: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch Basalkörper der Wildtyp- (a) und II N41-Zellen (b)

Die sternförmige Übergangsregion wird in den II N41-Zellen nicht mehr ausgebildet und das zentrale Mikrotubulipaar der Geißel ist im Basalkörper nachweisbar. Die elektronenmikroskopischen Analysen wurden von Dr. K.-F. Lehtreck durchgeführt.

Maßstab: 200 nm

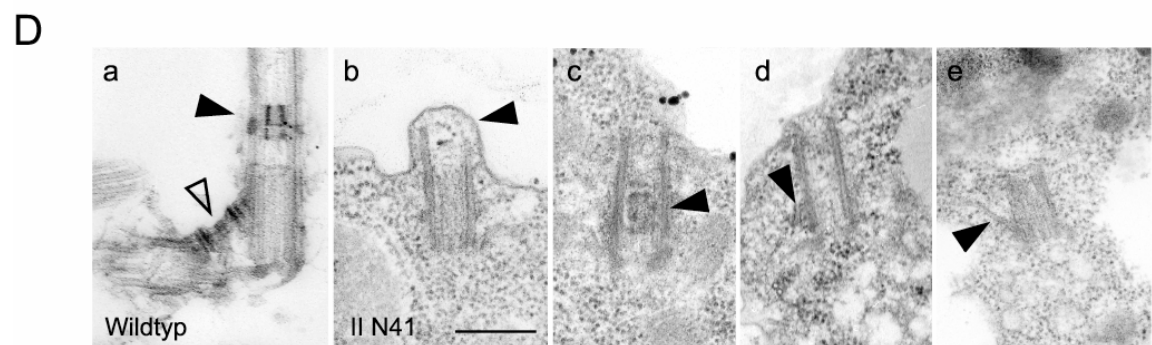
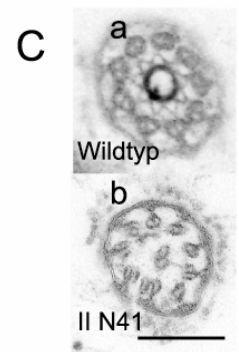
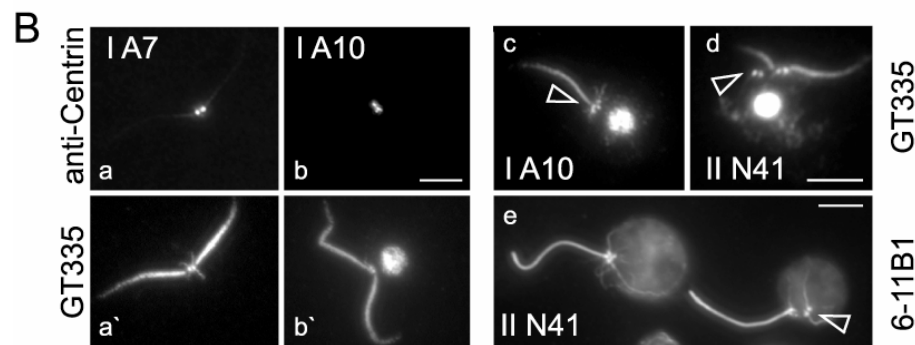
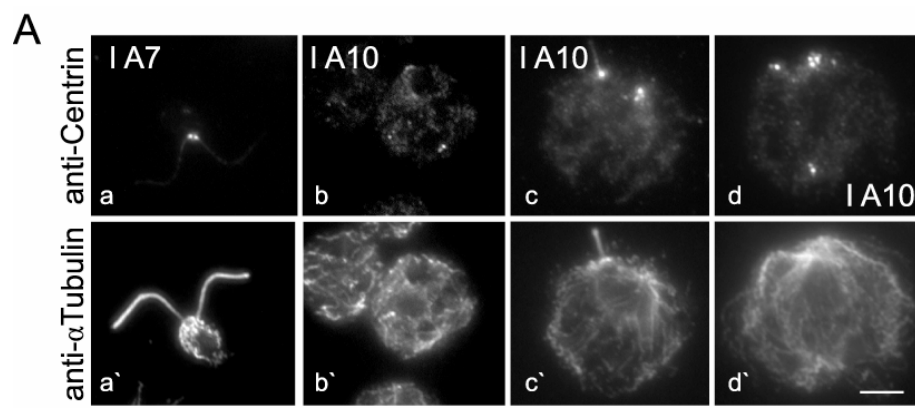
D: Elektronenmikroskopische Aufnahmen longitudinaler Schnitte durch Basalkörper der Wildtyp- (a) und II N41-Zellen (b-e)

a: Die Pfeile kennzeichnen die Übergangsregion zwischen Basalkörper und Axonema (Pfeilspitze) und die distale Verbindungsfibrille zwischen den Basalkörpern (Pfeil).

b-e: II N41-Zellen mit extrem kurzer (b) bzw. ohne Geißel (c-e) b: Die Abbildung zeigt eine II N41-Zelle mit defekter Übergangsregion (Pfeilspitze). Die Basalkörper der II N41-Zellen waren teilweise falsch an die Plasmamembran geheftet (c), oder lagen in cytoplasmatischen Bereichen der Zellen (d und e) vor. Diese Basalkörper waren z. T. mit Geißelwurzeln (Pfeilspitze in d) bzw. mit Mikrotubuli (Pfeilspitze in e) assoziiert. Darüber hinaus konnten Basalkörper detektiert werden, die elektronendichtes Material im Lumen aufwiesen (c).

Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden von Dr. K.-F. Lehtreck durchgeführt.

Maßstab: 200 nm



Zur weiteren Untersuchung der Basalkörper wurde die assoziierte Centrinmenge über die Intensität der Fluoreszenzsignale bestimmt. Hierfür wurden tritonlysierte Zellen mit dem monoklonalen Antikörper BAS 6.8 gefärbt und computergestützt (Metamorph 4.5r4) die durchschnittliche Intensität einer konstanten Region (Kasten in Abbildung 4A) der Fluoreszenz bestimmt. Als Kontrolle wurden identisch behandelte Zellen des RNAi-Stammes I A7 verwendet, da das Fehlen der distalen Verbindungsfibrille und der NBBCs die Messung der Fluoreszenzintensität der Basalkörper präziserte. Die Verminderung der Centrinexpression beeinflusste hingegen in diesem Stamm die Geißel- bzw. Basalkörperzahl nur gering, da 84,6% der Zellen zwei Geißeln und 94,5% zwei Basalkörper besaßen (vgl. Tabelle 1). Die Fluoreszenzintensitäten, die für den helleren der beiden Basalkörper von I A7 durchschnittlich berechnet wurden, wurden als 100% deklariert, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen.

Für die Interpretation dieser Daten ist zu berücksichtigen, dass die beiden Basalkörper einer Zelle ein unterschiedliches Alter aufweisen. Während der Mitose in *Chlamydomonas reinhardtii* werden jeder Tochterzelle ein Basalkörper der Mutterzelle und ein in der vorherigen Mitose neu gebildeter Basalkörper zugeteilt (Gaffal and el-Gammal, 1990). Das Alter dieser beiden Basalkörper unterscheidet sich demnach mindestens um eine Generation. Nach der Zellteilung ist auch der junge Basalkörper vollständig ausgereift und somit in der Lage, eine Geißel auszubilden. Die Assoziation eines Basalkörpers mit einer Geißel ist ein Zeichen für einen reifen Basalkörper.

Die in diesem Experiment zwischen den beiden Basalkörpern von I A7 detektierte Diskrepanz bezüglich des Centringehaltes von 8%, ist möglicherweise auf diesen unterschiedlichen Entwicklungsstand der Basalkörper zurückzuführen. Der Unterschied zwischen den Basalkörpern einer Zelle des RNAi-Stammes I A10 betrug hingegen bis zu 18% (Abbildung 4B: 1 Geißel/ 2 Basalkörper) und ist somit wahrscheinlich nicht nur durch das abweichende Alter der Basalkörper zu erklären. Verglichen mit dem helleren I A7-Signal war die Fluoreszenzintensität der Basalkörper des Stammes I A10 um mindestens 50% verringert (Abbildung 4B). Beträgt diese Verringerung mehr als 68%, konnten keine mit diesen Basalkörpern assoziierte Geißeln mehr nachgewiesen werden (Abbildung 4B: 1 Geißel/ 2 Basalkörper). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität eines geißellosen Basalkörpers des Stammes I A10 war verglichen mit der eines geißeltragenden Basalkörpers um mindestens weitere 10% verringert. Bei einer restlichen

Fluoreszenzintensität von ca. 50% des I A7-Wertes, konnte bei dem Stamm I A10 zusätzlich eine abweichende Anzahl der Basalkörpern detektiert werden (Abbildung 4B: 1 Geißel/ 1 Basalkörper; 0 Geißeln/ 3 Basalkörper).

Über die Bestimmung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität der Basalkörper konnte gezeigt werden, dass sowohl eine abweichende Anzahl an Basalkörpern, wie auch die Abwesenheit einer, mit den Basalkörpern assoziierten Geißel, mit einer sinkenden Centrinmenge einhergeht. Da das Tragen einer Geißel einen reifen Basalkörper charakterisiert, scheint der verminderte Centringehalt der Basalkörper den Reifungsprozess zu stören (vergleiche III.6).

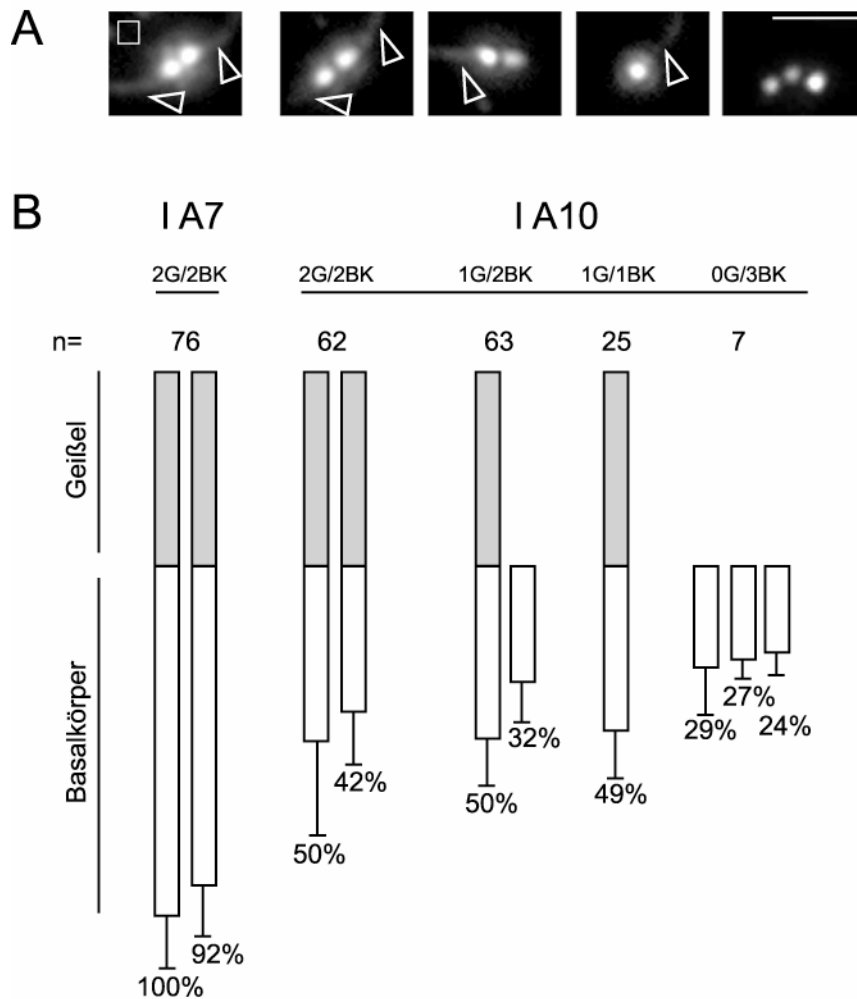


Abbildung 4: Bestimmung der, mit den Basalkörpern assoziierten relativen Centrinmenge der RNAi-Stämme I A7 und I A10

Die relative Centrinmenge der Basalkörper wurde über die durchschnittliche Fluoreszenzintensität dieser in einer konstanten Region (Kasten im 1. Bild) bestimmt.

A: anti-Centrin-gefärbte Fluoreszenzaufnahmen (mAK BAS 6.8; 1.20) tritonlysierter Zellen

Die Abbildung zeigt exemplarische Ausschnitte der Fluoreszenzbilder, die zur Messung eingesetzt wurden. Die erste Aufnahme (links) zeigt das Basalkörperpaar einer I A7-Zelle. Die weiteren Bilder wurden in Immunfluoreszenzpräparationen von I A10-Zellen aufgenommen. Die Pfeilspitzen in den Fluoreszenzbildern kennzeichnen Basalkörper-assozierte Geißeln.

Maßstab: 5 μ m

B: Statistische Auswertung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität

Der hellere Basalkörper von I A7 diente als 100%-Wert, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Der prozentuale Anteil der Fluoreszenzintensität des zweiten I A7-Basalkörpers und der I A10-Basalkörper ist angegeben. Die weißen Kästen in der Abbildung repräsentieren die Basalkörper (BK), die grauen Kästen die, mit diesen Basalkörpern assoziierten Geißeln (G).

Für die Bestimmung der Fluoreszenzintensität der BK in I A10-Zellen wurden exemplarisch vier Fälle verwendet: Zellen mit 1 G/ 2 BK, Zellen mit 1 G/ 1 BK und Zellen mit 0 G/ 3 BK.

n= Anzahl der gemessenen Zellen.

4. Auswirkungen des Centrinmangels auf die Prozesse der Zellteilung und auf die Lebensfähigkeit der Stämme

Alle bisher beschriebenen RNAi-Stämme wiesen in einigen Zellen eine fehlerhafte Anzahl an Basalkörpern auf. Da eine Ursache dieser Beobachtung die fehlerhafte Aufteilung der Basalkörper während der Mitose sein könnte, sollte in dem folgenden Experiment der Einfluss des Centrinmangels auf die Prozesse der Mitose untersucht werden. Während der Mitose in Wildtypzellen werden die vier Basalkörper, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, so aufgeteilt, dass jede Tochterzelle einen alten und einen neuen Basalkörper erhält. Während dieser Aufteilungsprozesse in *Chlamydomonas reinhardtii* ist Centrin bzw. sind die Basalkörper an den Spindelpolen lokalisiert (Coss, 1974; Wright et al., 1989). Für den Stamm vfl2 ("variable flagella number"), einer *Chlamydomonas*-Mutante mit einer Punktmutation im Centringen, wird diskutiert, dass dieser Aufteilungsmechanismus gestört ist (Marshall et al., 2001). Die Mutante bildet, ähnlich wie die hier beschriebenen RNAi-Stämme, einen Phänotyp mit einer variablen Anzahl an Basalkörpern aus (Wright et al., 1989). Es wird angenommen, dass die Fehlverteilung der Basalkörper während der Mitose auf das Fehlen der NBBCs zurückzuführen ist (Wright et al., 1985; Marshall et al., 2001). Die Prozesse der Mitose konnten in diesem Stamm jedoch nie direkt dargestellt werden.

Für die Analysen der Mitosen in den RNAi-Stämmen wurden zusätzlich zu I A10 zwei Stämme gewählt, die zu einem hohem Anteil zwei Geißeln (IV F11 79,7%; IV G10 58%) bzw. zwei Basalkörper (IV F11 80,7%; IV G10 79,5%) aufwiesen. Ausgewertet wurden die Mitosestadien dieser Stämme über Immunfluoreszenzpräparationen. In Abbildung 5 ist die Centrinfärbung (BAS mAK 6.8) der tritonlysierten Zellen in rot dargestellt, die α -Tubulinfärbung in grün und die Kernfärbung in blau (DAPI). Tabelle 3 zeigt eine Charakterisierung der in diesem Versuch verwendeten Stämme über Geißel- bzw. Basalkörperzahlen.

	Geißelzahl (%)							Basalkörperzahl (%)							
	0	1	2	3	4	Σ	n	0	1	2	3	4	5	Σ	n
Kontrolle	1,2	0,4	98,4	-	-	1,95	251	0,7	-	99,3	-	-	-	1,99	276
I A10	57,2	22	19,2	1,6	-	0,65	318	20,6	6,5	60,1	10,9	1,4	0,4	1,67	276
IV F11	9,9	8,9	79,7	1	0,5	1,73	202	5,1	2,3	80,7	5,1	2,8	-	2,05	176
IV G10	31	11	58	-	-	1,2	200	8,3	8,3	81,8	1,5	-	-	1,74	132

Tabelle 3: Übersicht der Geißel- bzw. Basalkörperzahlen der für die Mitoseversuche eingesetzten Kontroll- und RNAi-Stämme

Die Geißelzahlen wurden in lugolfixierten Zellen, die Basalkörperzahlen in anti-Centrin-gefärbten (mAK BAS 6.8; 1:20) Fluoreszenzpräparaten bestimmt.

Ø= durchschnittliche Geißel- bzw. Basalkörperzahl pro Zelle; n= Anzahl der Zellen

Die zuvor beschriebene Assoziation zwischen Centrin bzw. den Basalkörpern und den Spindelpolen wurde in den RNAi-Stämmen nicht ausgebildet (vgl. Abbildung 5). Das Fehlen dieser Assoziation resultierte in einer räumlichen Distanz von ca. 3 µm zwischen Spindelpol und Basalkörper. In Teilungsstadien des Stammes IV F11 fand in 18 von 19 Fällen keine Assoziation der Basalkörper mit den Spindelpolen statt. Da das Loslösen der Basalkörper von den Spindelpolen und somit die räumliche Distanz dieser zueinander in allen drei RNAi-Stämmen zu beobachten war, scheint es auf ein Fehlen der centrinhaltigen Strukturen zurückzuführen sein. Denn dieser RNAi-Effekt war charakteristisch für alle verwendeten Stämme. In Zellen der Stämme mit geringem RNAi-Effekt, wie z.B. IV F11 scheint demnach die Centrinmenge so stark reduziert zu sein, dass die Basalkörper nicht mehr an den Spindelpolen fixiert werden konnten. Die Segregation verlief jedoch zu großen Teilen weiterhin korrekt (Abbildung 5e,f). Diese Annahme basiert auf den Basalkörperzählungen dieses Stammes, der zu einem hohen Anteil durch Zellen mit zwei Basalkörpern charakterisiert wurde (Tabelle 3). In dem RNAi-Stamm I A10 sowie in einigen Zellen von IV F11 bzw. IV G10, reichte die verbliebene Centrinmenge nicht mehr aus, um eine korrekte Aufteilung zu ermöglichen. Es kam hier zu Segregationsdefekten (z. B. Abbildung 5d,g,k,l und m). Zusätzliche bzw. fehlende Basalkörper hatten, soweit diese Untersuchungen es zeigen, keinen Einfluss auf die Organisation der Spindel. Zusätzliche Basalkörper wurden während der Mitose auf die Tochterzellen verteilt (Abbildung 5h). In Zellen, die keine Basalkörper besaßen, wurde die Spindel weiterhin organisiert (Abbildung 5j). Inwieweit diese basalkörperfreien Zellen den Abschluss der Mitose und die folgende Zellteilung korrekt durchlaufen würden,

konnte in diesem Experiment nicht untersucht werden, da die Zellen zur Antikörper-Färbung fixiert und lysiert wurden.

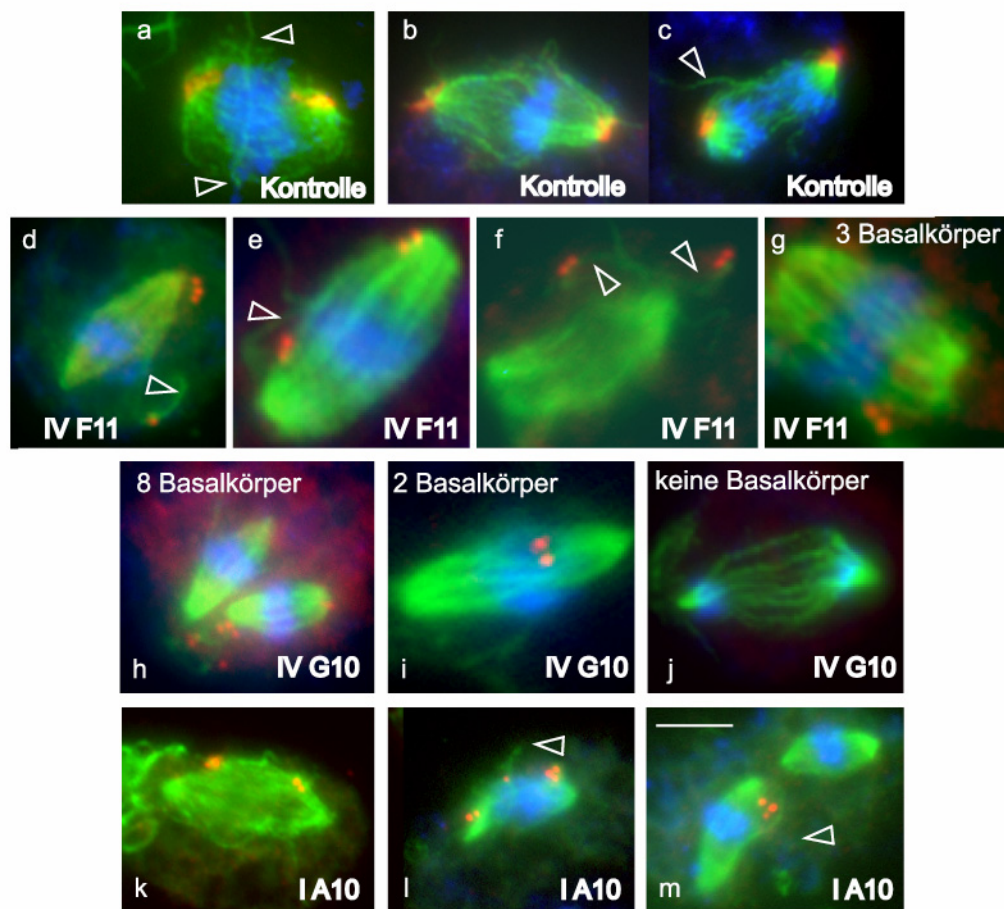


Abbildung 5: Fluoreszenzaufnahmen von Kontroll- und RNAi-Zellen während der Mitose

Die Abbildung zeigt Tripelimmunfluoreszenzen der Kontrollzellen (a-c) sowie von RNAi-Zellen der Stämme IV F11 (d-g), IV G10 (h-j) und I A10 (k-m) während der Mitose. Die Zellen wurden während der Präparation der Fluoreszenzen durch Triton lysiert.

grün: α -Tubulin-Färbung (1:800); rot: anti-Centrin-Färbung (mAK BAS 6.8; 1:20); blau: Kernfärbung (DAPI)

Die Pfeile in den Aufnahmen kennzeichnen die Metaphasebänder, die mit den Basalkörpern während der Mitose assoziiert sind.

Maßstab: 5 μ m

In den Zellen des Stammes IV F11 konnte eine Assoziation der Basalkörper mit mikrotubulären Bändern nachgewiesen werden (Pfeile in Abbildung 5d,e und f). Es handelte sich hierbei um eine Struktur, die als „Metaphaseband“ beschrieben wurde (Johnson und Porter, 1968). Das „Metaphaseband“ bildet sich während der Mitose in *Chamydomonas reinhardtii* und leitet sich aus den viersträngigen mikrotubulären Geißelwurzeln der Interphase ab (Gaffal und el-Gammal, 1990). Während der Mitose entspringen diese Bänder in der Nähe der Basalkörperpaare und laufen parallel zu der Spindel. In der Höhe des Kerns überlappen die beiden Bänder in antiparalleler Orientierung. Ausgehend von dieser Region beschreiben die beiden Enden einen Bogen und verlaufen senkrecht zu den Spindelmikrotubuli - beidseitig des Kerns - in das Zellinnere (Gaffal und el-Gammal, 1990). In den untersuchten Zellen des Stammes I A10 schien dieses Metaphaseband gestört oder abwesend zu sein (Abbildung 5k,l und m).

Im Folgenden wurde die Anzahl der Kerne in den Zellen DAPI-gefärbter Fluoreszenzpräparationen bestimmt und statistisch ausgewertet. Sowohl in I A10, wie auch vermehrt in II N41, konnten mehrkernige Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil dieser Zellen lag für I A10 bei 7%, für II N41 bei 17% (Abbildung 6d). Auch konnte in einigen II N41-Zellen eine erhöhte Anzahl an Pyrenoiden nachgewiesen werden (Pfeile in Abbildung 6a). Diese Beobachtungen deuten auf Fehler während der Mitose und der Zellteilung hin.

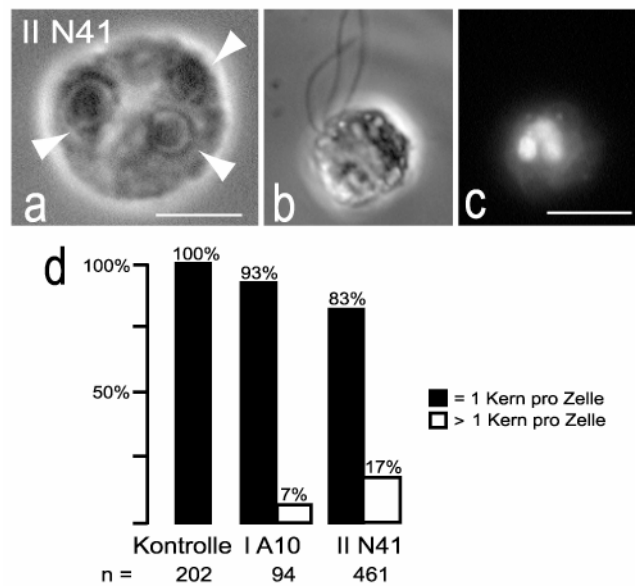


Abbildung 6: Einfluss der verringerten Centrinmenge auf die Prozesse der Zellteilung

a: II N41-Zelle mit drei Pyrenoiden (Pfeilspitzen), Maßstab: 5 μ m

b und c: Phasenkontrastaufnahme (b) bzw. Kernfärbung (Syto25; c) einer tritonlysierten II N41-Zelle mit drei Geißeln und drei Kernen, Maßstab: 10 μ m

Das Diagramm (d) zeigt den statistische Anteil an mehrkernigen Zellen an der Gesamtheit der Kontroll-, I A10- und II N41-Zellen.

n= Anzahl der untersuchten Zellen

Um die Überlebensfähigkeit der basalkörperlosen Zellen zu charakterisieren, wurden Einzelzellanalysen durchgeführt. Hierzu wurden zwei Stämme mit einem starken RNAi-Effekt (VI E5 und VII G4; Übersicht siehe Tabelle 4) sowie ein Kontrollstamm über das FACS ("fluorescence associated cell sorter") sortiert und die Einzelzellen in 96er Zellkulturplatten kultiviert. Für die weiteren Analysen wurden nur Stämme eingesetzt, die aus geißellosen Einzelzellen hervorgingen. Als Kontrolle diente der Stamm pf15 ("paralyzed flagella"; Brokaw und Luck, 1985), der, aufgrund eines "knock-outs" des Kataningens, keine zentralen Mikrotubulipaaire in den Geißeln mehr ausbildet und deshalb unbeweglich ist (Smith and Lefebvre, 1997). Diese "knock-out"-Mutation hat, soweit bekannt, keinen Einfluss auf die Prozesse der Zellteilung, die in diesem Experiment untersucht wurden. Die bisher beschriebene Kontrolle mit zwei funktionstüchtigen Geißeln konnte hier nicht verwendet werden, da bei diesem Stamm die Effizienz der Zellsortierung auf 6% reduziert war (17 Einzelzellen bei 288 Ansätzen), was eventuell auf die Eigendynamik der Zellen während des Sortierungsprozesses zurückzuführen ist. Die Sortierungseffizienz des pf15-Stammes lag vergleichsweise bei 69% (66 Einzelzellen aus 96 Ansätzen). Eine

Übersicht über den Phänotyp, der zur Einzelzellanalyse eingesetzten Stämme, stellt Tabelle 4 dar.

	Geißelzahl (%)								Centrinspots (%)							
	0	1	2	3	4	Ø	n		0	1	2	3	4	5	Ø	n
pf15									0,7	-	99,3	-	-	-	1,99	276
VI E5	83,9	6,8	9,3	-	-	0,25	205		68,6	11,7	14,9	4,2	0,5	-	0,56	188
VII G4	98,2	1,8	-	-	-	0,02	114		65,7	7,3	14,6	7,3	5,1	-	0,78	137

Tabelle 4: Übersicht über die zur Einzelzellanalyse eingesetzten Stämme pf15, VI E5 und VII G4

Die Geißelzählungen wurden in lugolfixierten Zellen, die Zählungen der Basalkörper in anti-Centrin-gefärbten (mAK BAS 6.8; 1:20) Fluoreszenzpräparaten durchgeführt.

Ø= durchschnittliche Geißel- bzw. Basalkörperzahl pro Zelle; n= Anzahl der gezählten Zellen

Insgesamt wurden 119 Einzelzellen der RNAi-Stämme in die Kalkulation der Sterblichkeit einbezogen (80 Zellen des VI E5-Ansatzes und weitere 39 Zellen des VII G4-Ansatzes). Die Letalitätsquote der RNAi-Stämme lag bei 19,3% (16 Stämme bei VI E5; 7 Stämme bei VII G4), die 42 vereinzelt Kontrollzellen wuchsen alle an. Des weiteren konnte durch diesen Ansatz festgestellt werden, dass alle Einzelzellen der RNAi-Stämme Nachkommen mit Geißeln erzeugten. Bei 75% der Kolonien wurden innerhalb der ersten vier Tage Zellen mit Geißeln beobachtet, nach neun besaßen bereits 96,9% der Stämme Zellen mit Geißeln. Der durchschnittliche Phänotyp der isolierten Stämme entsprach der Stärke des Phänotyps des Ausgangsstammes. Lediglich eine Kultur der Einzelzellen generierte erst nach ca. 35 Tagen Geißeln und wies einen stärkeren Phänotyp (89,5 % der Zellen ohne Basalkörper, n= 159; 99% ohne Geißeln, n=105) als der Ausgangsstamm auf.

5. Folgen der reduzierten Centrinexpression auf die Organisation der basal-körperassoziierten Fasersysteme und des mikrotubulären Netzwerkes der Zellen

In *Chlamydomonas reinhardtii* stellen die Basalkörper die übergeordneten mikrotubuliorganisierenden Zentren ("microtubular organisation centrum"; MTOCs) der Zellen dar. Von diesen Strukturen ausgehend findet die Polymerisation des Tubulins statt (Mitchison und Kirschner, 1984). In den folgenden Untersuchungen sollte der Einfluss der zusätzlichen bzw. das Fehlen der Basalkörper auf die Organisation der assoziierten mikrotubulären Wurzeln und des mikrotubulären Gerüsts der Zellen charakterisiert werden. Hierzu wurden isolierte Cytoskelette mit den Antikörpern GT335 und 6-11B-1 gefärbt. Des weiteren wurde ein GFP-SF Assemblin (GFP-SFA) exprimierender Stamm mit einer verkleinerten Form des pCB740/RNAi-Vektors transformiert (siehe II. Material und Methoden). SFA ist der Hauptbestandteil der gestreiften Fasern in Wildtypzellen, die mit den vier an den Basalkörpern entspringenden tubulären Wurzeln assoziiert sind (Lehtreck et al., 2002). Dieser Stamm wurde mir freundlicherweise von Jutta Schoppmeier zur Verfügung gestellt.

Doppelimmunfluoreszenzen mit anti-Centrin- (mAK BAS 6.8) und anti- α -Tubulin-Antikörpern der Kontrollzellen zeigten ein weitläufiges tubuläres System, dessen Ausgangspunkt der Basalapparat bildete. Zusätzliche Basalkörper in den I A10-Zellen funktionierten als zusätzliche MTOCs, so dass es zu einer polyzentrischen Organisation des tubulären Gerüsts kam (Abbildung 7Aa und a'). Doppelfluoreszenzen gegen α -Tubulin und polyglutamyliertes Tubulin bestätigten diese Ergebnisse. Auch hier wurden ausgehend von den zusätzlichen Basalkörpern Mikrotubuli organisiert (Abbildung 7Ac). Abbildung 7Ac zeigt die bizentrische Organisation des tubulären Systems ausgehend von den drei Basalkörpern einer RNAi-Zelle. Im Unterschied dazu führte das Fehlen von Basalkörpern in den Zellen zu einem ungeordneten Mikrotubuli-Cytoskelett (Abbildung 7Ab). Die in den Kontrollzellen deutlich ausgebildeten vier acetylierten Mikrotubulibänder, die vom Basalapparat ausgingen (Abbildung 7Af), waren in den RNAi-Stämmen ebenfalls gestört. In den II N41-Zellen konnte meist eine Verringerung der Faseranzahl festgestellt werden (Abbildung 7Ag). In Zellen ohne Basalkörper kam es in einigen Fällen zur Ausbildung ungeordneter Fasern, in anderen Fällen fehlten diese Fasern. In Kontrollzellen bilden die vier SFA-Fibrillen eine kreuzförmige Struktur (Abbildung

7Ba). Diese Struktur wird aus zwei kurzen Fasern, assoziiert mit den aus zwei Tubulinsträngen bestehenden Geißelwurzeln und zwei langen Fasern, die mit den aus vier Mikrotubuli bestehenden Geißelwurzeln verbunden sind, gebildet (Lechtreck et al., 2002). Diese Kreuzstruktur wurde in RNAi-Zellen nicht korrekt ausgebildet, was auf eine fehlerhafte Organisation der mikrotubulären Wurzeln schließen lässt (Abbildung 7Bb-e). Zusätzliche Basalkörper dienten auch hier als Organisationszentren für zusätzliche Fasern (Abbildung 7Bc,d). In Zellen ohne Basalkörper wurden keine GFP-SFA-Faser mehr ausgebildet (Abbildung 7Be). Auch RNAi-Zellen, die zwei Basalkörpern besaßen, bildeten fehlerhafte Assemblinfasern aus (Abbildung 7Bb). Abbildung 7 gibt eine Übersicht über die hier beschriebenen Ergebnisse.

Abbildung 7: Die Folgen der variierenden Basalkörperzahl in RNAi-Zellen auf die Ausbildung der tubulären Wurzeln bzw. des tubulären Cytoskeletts

A: Immunfluoreszenzaufnahmen tritonlysierter Kontroll- (d-f) und I A10-Zellen (a-c) sowie methanol-fixierter II N41-Zellen (g)

Die Färbungen der Kontrollzellen zeigen die fokussierte Organisation des mikrotubulären Gerüsts der Zellen (d; α -Tubulinfärbung; 1:800), die beiden polyglutamylierten Basalkörper (e; GT335; 1:1200) und die vier acetylierten Mikrotubulibänder (Pfeile in f; 6-11B1; 1:300; Pfeilspitzen: Axonema).

Zusätzliche Basalkörper (a,c) in RNAi-Zellen dienten als zusätzliche MTOCs (Pfeilspitzen in a', c'). Das Fehlen der Basalkörper in den Zellen (b) resultierte in einem ungeordneten Mikrotubuli-Cytoskelett (b'). II N41-Zellen (g) mit Basalkörpern (Zelle 1 und 2) zeigten teilweise eine fehlerhafte Anzahl an acetylierten Mikrotubuli (Zelle 2). In Zellen ohne Basalkörpern (Zelle 3 und 4) fehlten diese Strukturen (Zelle 4) oder wurden nur vereinzelt (Zelle 3) ausgebildet.

a und b: Antikörperfärbungen gegen Centrin (mAK BAS 6.8; 1:20). c: GT335-Färbung (1:1200) a', b' und c': korrespondierende α -Tubulinfärbung (1:800). g: Färbung gegen acetyliertes Tubulin (6-11B1; 1:300)

Maßstab: 5 μ m

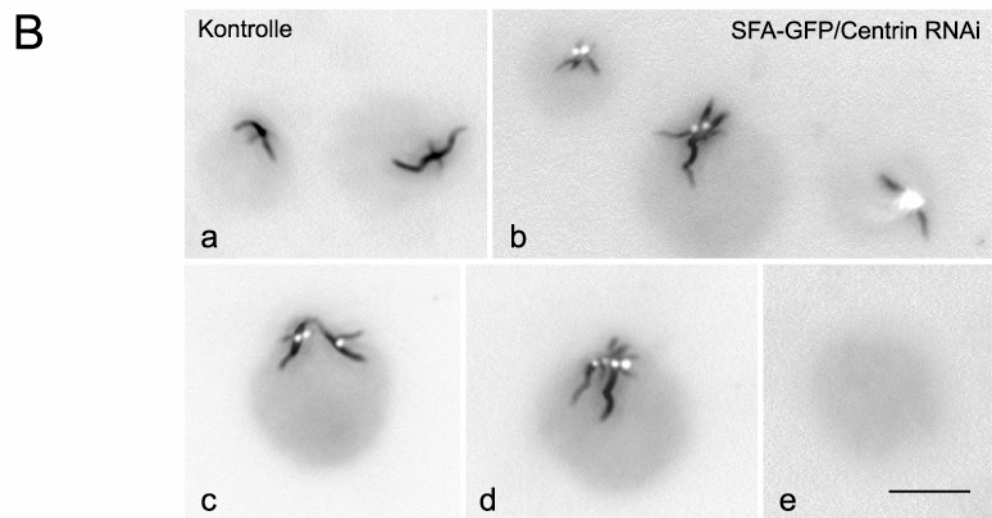
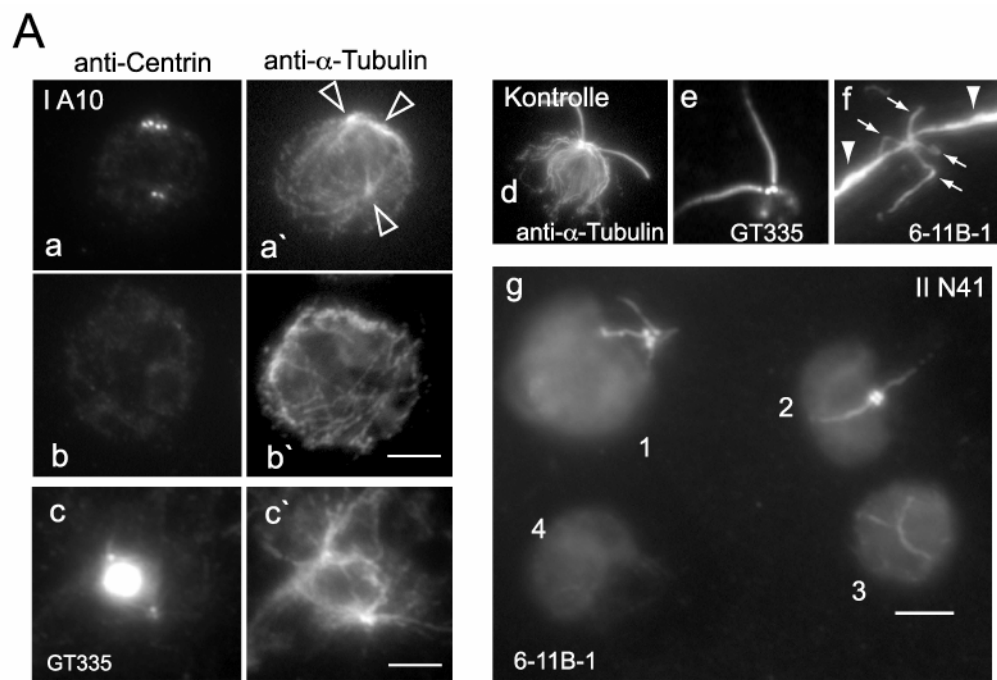
B: Immunfluoreszenzaufnahmen SFA-GFP-exprimierender Kontroll- (a) und RNAi-Zellen (b-e)

Die Zellen wurden vor der Antikörperfärbung durch Methanol fixiert.

schwarz: GFP-SFA, weiß: anti-Centrin-Färbung (mAK BAS 6.8; 1:20)

In Kontrollzellen bilden die SFA-Fasern eine kreuzförmige Struktur aus zwei kurzen und zwei langen SFA-Fasern. Centrin-RNAi-Zellen bildeten diese Struktur nicht mehr aus. Die SFA-Fasern wurden mit einer fehlerhaften Anzahl (b,d) gebildet oder fehlten (e).

Maßstab: 5 μ m



6. Einfluss des verminderten Centringehaltes auf die Reifung der Basalkörper

In *Chlamydomonas reinhardtii* ist Centrin kein Bestandteil der Basalkörper selber, vielmehr ist es Hauptbestandteil der assoziierten Faser (distale Verbindungsfibrille, NBBCs) und der Übergangsregion zwischen Basalkörper und Geißel. Die punktförmigen Centrinsignale an den Basalkörpern der RNAi-Stämme resultierten vermutlich aus Resten dieser centrinhaltigen Strukturen. Im Folgenden sollte der Einfluss Centrins während der Basalkörperentstehung bzw. -reifung in den RNAi-Stämmen untersucht werden. Die Basalkörper von *Chlamydomonas reinhardtii* duplizieren sich in der späten Mitose (Gaffal und el-Gammal, 1990). Während der Basalkörperreifung werden diese Probasalkörper in einem frühen Stadium acetyliert. Polyglutamylierungen sind erst in reifen Basalkörpern zu detektieren (Lehtreck und Geimer, 2000). Auch das Ausbilden einer Geißel ist ein Indiz für einen reifen Basalkörper. Um zu analysieren, wann Centrin während der Reifung der Basalkörper in den RNAi-Zellen nachzuweisen war, wurden Doppelfluoreszenzen gegen Centrin bzw. gegen acetyliertes (6-11B-1) und polyglutamyliertes Tubulin (GT335) durchgeführt. Acetylierte Probasalkörper befinden sich in räumlicher Nähe zu reifen Basalkörpern, sie liegen zwischen den Wurzeln des Basalapparates. In den Probasalkörpern der RNAi-Stämmen konnte - ähnlich wie in Kontrollzellen - Centrin nicht nachgewiesen werden (Abbildung 8Ab). Dies deutet daraufhin, dass zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung Centrin nicht mit den Basalkörpern assoziiert war und erst während des folgenden Reifungsprozesses akkumuliert wurde. Darüber hinaus konnte in den Centrin RNAi-Zellen eine abweichende Anzahl an Probasalkörpern detektiert werden (Abbildung 8Ab), was eventuell auf Segregationsdefekte während der Mitose zurückzuführen ist (vgl. III.4). In centrinpositiven Basalkörpern konnte immer polyglutamyliertes Tubulin nachgewiesen werden (Abbildung 8B), während 5% der Basalkörper, die ein GT335 Signal zeigten, kein Centrin beinhalten (z.B. Abbildung 8Ba und a'). In einigen seltenen Fällen waren die polyglutamylierten, centrinfreien Basalkörper mit einer Geißel assoziiert. Die Korrelation zwischen der Centrinmenge in den Zellen und der Assoziation einer Geißeln wurde bereits unter III.3 beschrieben (vgl. Abbildung 4). Auch hier wurde ein Bezug zwischen Centrinmenge und der Fähigkeit zur Geißelbildung hergestellt.

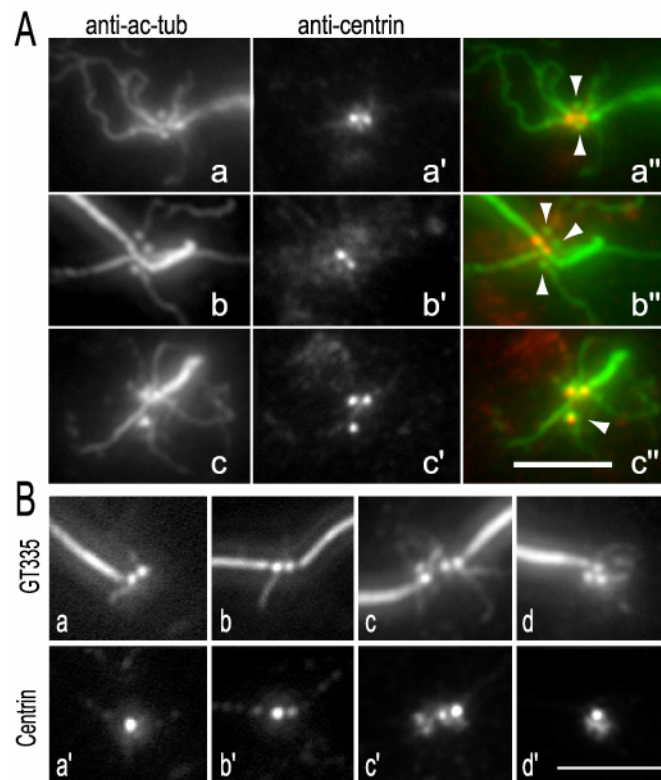


Abbildung 8: Die Folgen des Centrinmangels auf die Reifung der Basalkörper

A: Isolierte Cytoskelette des RNAi-Stammes II N41 wurden mit Antikörpern gegen acetyliertes Tubulin (6-11B-1; 1:300; a-c) und Centrin (pCen; 1:200; a'-c') gefärbt.

a''-c'': Kombination der beiden Fluoreszenzsignale, grün: acetyliertes Tubulin, rot: Centrin
Centrinfreie Probasalkörper (Pfeile in a'' und b'') konnten durch die Färbung des acetylierten Tubulins z. T. in abweichender Zahl (b'') detektiert werden.

c: Zelle mit drei centrinhaltigen Basalkörpern, jedoch ohne centrinfreie Probasalkörper

Maßstab: 5 µm

B: Färbungen mit Antikörpern gegen polyglutamyliertes Tubulin (GT335; 1:1200) und Centrin (a',b': mAK BAS 6.8; 1:20; c',d': pAK Cen2; 1:200) in isolierten Cytoskeletten von II N41

Einige Basalkörper in II N41 wiesen Polyglutamylierungen des Tubulins, jedoch kein (a) bzw. wenig (b-d) Centrin auf.

Maßstab: 5 µm

7. Design eines induzierbaren RNAi-Konstruktes

In den bisher verwendeten pCB740/RNAi-Stämmen lagen zwischen der Transformation des Stammes und der Analyse des RNAi-Effektes aus methodischen Gründen ca. vier Wochen, in denen sich der zentrindefiziente Phänotyp vollständig ausbildete. Für die folgenden Studien wurde ein Konstrukt entwickelt, welches die Induktion des RNAi-Mechanismus durch eine Änderung der Kulturbedingungen ermöglichte und somit erlaubte, den zeitlichen Verlauf des Stammes, unter RNAi-induzierenden Bedingungen, zu beobachten. Ebenfalls konnte so unter repressiven Bedingungen ein Stamm kultiviert werden, der erst bei Bedarf induziert und in den RNAi-Phänotyp überführt wurde. Basierend auf der Annahme, dass unter repressiven Konditionen das RNAi-induzierende Konstrukt nicht ausgeschaltet werden würde (vergleiche III.10), ergab sich so die Möglichkeit der Kultivierung eines Stammes, der über eine längere Zeitperiode stabil war und bei Bedarf induziert werden konnte. Hierzu wurde das Konstrukt unter die Kontrolle des Nitratreduktase-Promotors gestellt (Nit1). Dieser Promotor steuert in *Chlamydomonas reinhardtii* die Expression der Nitratreduktase unter ammoniumfreien Bedingungen (Zhang und Lefebvre, 1997; Abbildung 9A). Der Promotor wurde aus genomischer DNA von *Chlamydomonas reinhardtii* amplifiziert und vor das RNAi-induzierende Konstrukt im pCrGFP kloniert. Der Transformationstamm CC-3395 wurde mit diesem Vektor und dem Argininosuccinat-Lyase-Gen als Selektionsmarker kotransformiert und auf festem Medium mit Ammonium, aber ohne Arginin, selektioniert. Die Klonkolonien wurden zuerst in flüssigem ammoniumhaltigen Medium angezogen und dann in Medium, welches Nitrat anstelle von Ammonium beinhaltete, transferiert. Die weitere Selektion der Stämme fand unter diesen Bedingungen statt (vgl. III.1).

Die Induktion des Promotors durch die Abwesenheit von Ammonium wird verstärkt durch die Kultivierung der Stämme bei Dauerlicht bzw. durch Ersatz des im Medium erhaltenen Molybdän durch Wolframat (Loppes et al., 1999). Eine schematische Übersicht über die Funktionsweisen des Konstruktes und die Studien zur Effizienz des induzierbaren RNAi-Vektors sind in Abbildung 9 dargestellt.

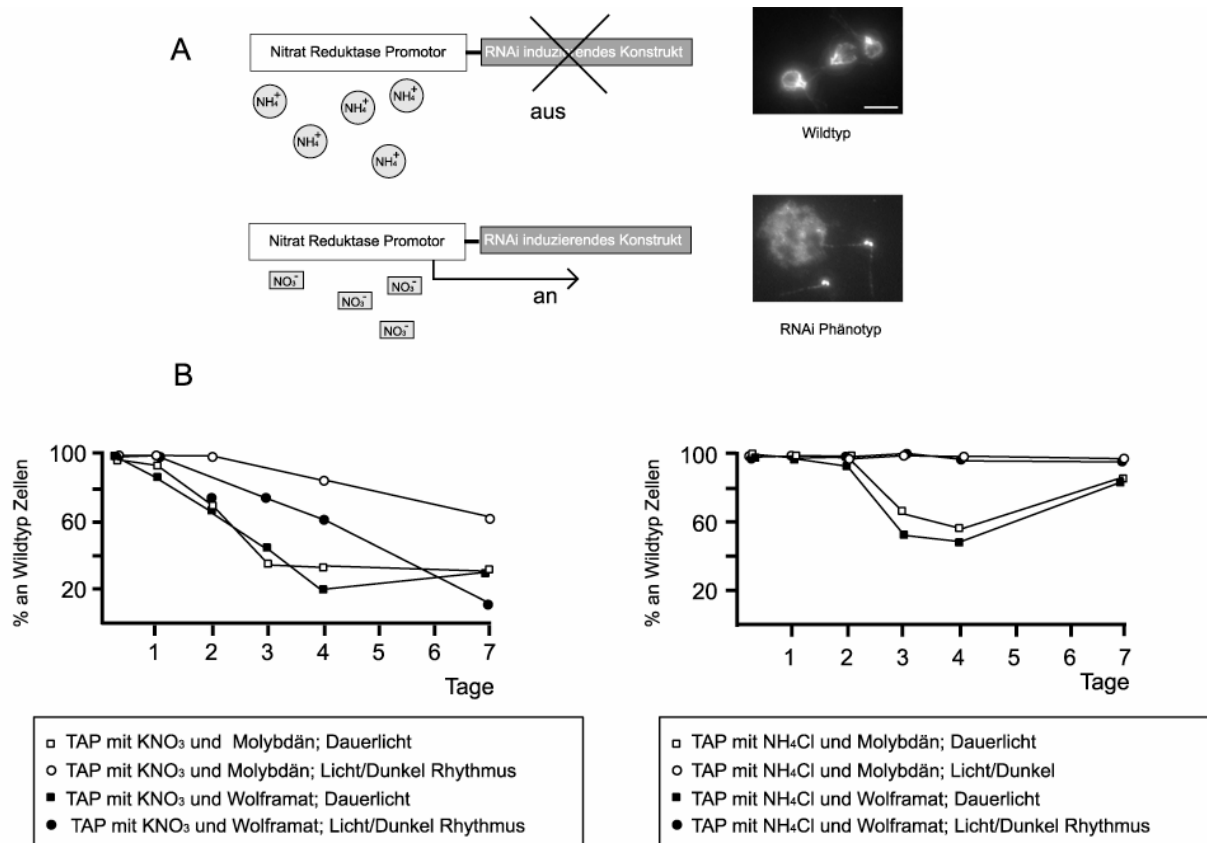


Abbildung 9: Übersicht zur Funktion und Effizienz des RNAi-induzierenden Konstruktes

A: Schematische Übersicht über die Funktionsweisen des RNAi-induzierenden Konstruktes
 oben: Unter ammoniumhaltigen Bedingungen findet keine Transkription des RNAi-induzierenden Konstruktes statt. Die Zellen weisen einen Wildtyp-Phänotyp auf.
 unten: Nitrat, als einzige Stickstoffquelle im Medium, induziert den Promotor. Es kommt zur Transkription des Konstruktes, die Zellen weisen einen RNAi-Phänotyp auf.

B: Effizienzstudien zur Induktion des Promotors über einen Zeitraum von sieben Tagen
 links: Kultivierung der Zellen in nitrathaltigem TAP unter variablen Bedingungen, rechts: Kultivierung der Zellen in ammoniumhaltigem TAP unter variablen Bedingungen.

Kulturbedingungen mit Dauerlicht induzierten den Promotor auch unter repressiven Bedingungen in Ammonium (Abbildung 9B, 2.Graph) und beschleunigten die Induktion in ammoniumfreien Nitrat-Medium (Abbildung 9B, 1.Graph). Der Zusatz von Wolframat anstelle von Molybdän hingegen konnte die Induktion in Nitrat-Medium zwar verstärken, war alleine aber nicht ausreichend um einen Effekt im Phänotyp zu bewirken (vgl. Abbildung 9B, 2.Graph: Wolframat; Licht/Dunkel Rhythmus). Abgeleitet aus diesen Untersuchungen wurden für die Repression des RNAi-induzierenden Konstruktes Kulturen unter Schwachlicht und in ammoniumhaltigem Medium kultiviert. Die induzierten Kulturen wurden in ammoniumfreiem Nitrat-Medium unter Dauerlicht gehalten. Auf die Zugabe von Wolframat zu dem Medium wurde verzichtet.

8. Charakterisierung des induzierbaren RNAi-Stammes

In Abbildung 10 wurde der für die folgenden Untersuchungen gewählte Stamm (Nit/RNAi) durch anti-Centrin-gefärbte Immunfluoreszenzpräparate, Western- bzw. Northernblot sowie durch Basalkörperzählung charakterisiert. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen isolierte Cytoskelette des Stammes Nit/RNAi sowie der Kontrolle, die mit Antikörpern gegen Centrin (mAK BAS 6.8) gefärbt wurden. In den Kontrollzellen, sowie in den Zellen des Stammes, der unter ammoniumhaltigen Bedingungen kultiviert wurde, zeigte sich kein Einfluss auf den Phänotyp. Beide Kulturen bildeten das Wildtyp-Centrinsystem aus. Der unter ammoniumfreien Bedingungen kultivierte Stamm wies einen RNAi-Phänotyp (vergleiche III.2) auf, der durch das Fehlen der centrinhaltigen Strukturen (NBBCs und die distale Verbindungsfibrille) in Immunfluoreszenzpräparationen charakterisiert werden konnte. 57,2% der Zellen dieser Kultur besaßen zwei Basalkörper. 26,5% der Zellen wiesen eine verringerte Anzahl, 14,2% der Zellen wiederum eine erhöhte Anzahl an Basalkörpern auf (Abbildung 10C). Ein Transfer dieser Kultur zurück in ammoniumhaltiges Medium bewirkte die erneute Bildung des Wildtyp-Phänotyps mit zwei Basalkörpern und den assoziierten centrinhaltigen Strukturen.

Die Northernanalysen, die zur weiteren Charakterisierung der Stämme unter den verschiedenen Kulturbedingungen durchgeführt wurden, sind in Abbildung 10B dargestellt. Für die Analysen wurde die isolierte Gesamt-RNA-Fraktion der zu testenden Stämme eingesetzt. Als Sonde gegen die Centrin-mRNA wurde radioaktiv

markierte Centrin-cDNA eingesetzt (Abbildung 10B oben). Als Ladungskontrolle (Abbildung 10B unten) diente DIG-markierte cDNA des Proteins Cb2p. Die Größe der Bande, die durch die Centrin-cDNA-Sonde detektiert wurde, konnte aufgrund eines Vergleiches mit einem RNA-Größenstandards auf ca. 1000 bp bestimmt werden. Dies entspricht mit einer geringen Abweichung, die auf Ungenauigkeiten des Verfahrens zur Größenbestimmung zurückzuführen ist, der in der Datenbank angegebenen Größe der Centrin-mRNA von 984 bp. Sowohl in der Gesamt-RNA-Fraktion der Kontrolle, wie auch in der nicht induzierten Nit/RNAi-Kultur, war im Northernblot die als Centrin mRNA charakterisierte Bande nachweisbar (Abbildung 10B oben, Wildtyp und NH_4Cl). Im Gegensatz dazu konnte unter induzierenden Kulturbedingungen durch diese Northernanalyse die Centrin-mRNA nicht mehr detektiert werden (Abbildung 10B oben, KNO_3). Nach einem Transfer dieser induzierten Kultur zurück in ammoniumhaltiges Medium, war das Transkript des Centringens erneut nachweisbar (Abbildung 10B oben, KNO_3 - NH_4Cl). Der Northernblot bestätigt somit, dass die Verminderung Centrins durch eine Verminderung der Centrin-mRNA in den Zellen hervorgerufen wurde.

In den durchgeführten Westernanalysen konnte in Proteinproben, der unter repressiven Bedingungen kultivierten Stämme sowie in Wildtypzellen, durch anti-Centrin Färbung eine Proteinbande bei 20 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 10D, unten). Dies entspricht dem apparenten Molekulargewicht Centrins. Unter induzierenden Kulturbedingungen war diese Centrin-Proteinmenge vermindert (Abbildung 10D, unten, KNO_3). Auch hier wurde die Expression Centrins durch einen erneuten Transfer der induzierten Kultur in ammoniumhaltiges Medium wieder hergestellt (Abbildung 10D, unten, KNO_3 - NH_4Cl). Um ausschließen zu können, dass die unterschiedliche Intensität der anti-Centrin-gefärbten Bande auf eine abweichende Proteinkonzentration in den Spuren zurückzuführen ist, wurde die obere Hälfte des Westernblots als Ladungskontrolle in Amidoschwarz gefärbt.

Der Rückgang bzw. die Erholung der Centrinexpression konnte auf Proteinniveau durch Westernanalysen verifiziert werden. Der Vektor erlaubt somit die reversible Induktion des centrindefizienten Phänotyps durch eine Änderung der Kulturbedingungen.

Abbildung 10: Übersicht über den induzierbaren RNAi-Stamm Nit/RNAi

Der Nit/RNAi-Stamm wurde unter induzierenden (KNO_3) und unter repressiven (NH_4Cl) Konditionen kultiviert. Zusätzlich wurde der Stamm, der zuerst unter induzierenden Bedingungen kultiviert worden war, erneut in ammoniumhaltiges Medium ($\text{KNO}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$) transferiert. Die Abbildung zeigt die reversible Induktion des Stammes anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen (A), Northern- (B) und Westernblots (D) sowie durch die durchschnittliche Basalkörperzahl der Zellen (C).

A: Immunfluoreszenzaufnahmen anti-Centrin-gefärbter (mAK BAS 6.8; 1:20) isolierter Cytoskelette unter verschiedenen Kulturbedingungen

B: Northernblot zum Nachweis des reversiblen Abbaus der mRNA

oben: die Centrin-mRNA wurde mit einer Sonde gegen Fragmente der kodierenden Region von Centrin nachgewiesen, unten: die mRNA gegen Cb2p wurde als Ladungskontrolle verwendet

Es wurden 25 μg Gesamt-RNA pro Spur geladen und über eine 1,5%iges Agarosegel aufgetrennt. Als Transfermembran diente eine positiv geladene Nylonmembran.

C: Übersicht über die Basalkörperanzahl des Stammes unter verschiedenen Kulturbedingungen

Die Anzahl der Basalkörper wurde in methanolfixierten anti-centrin-gefärbten Fluoreszenzpräparaten bestimmt (mAK BAS 6.8; 1:20).

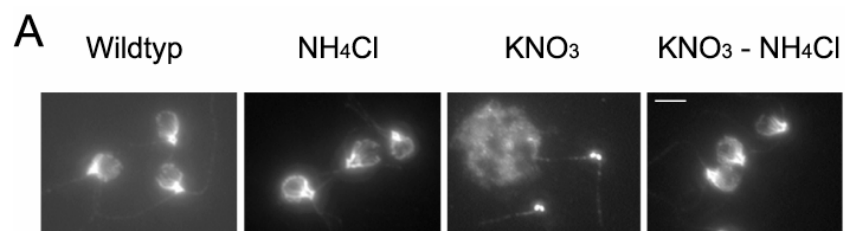
Ø: durchschnittliche Anzahl an Basalkörpern pro Zelle; n: Anzahl der Zellen

D: Westernblot zum Nachweis der verringerten Proteinexpression

25 μg Gesamtprotein des Pellets der tritonlysierter Zellen wurde über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

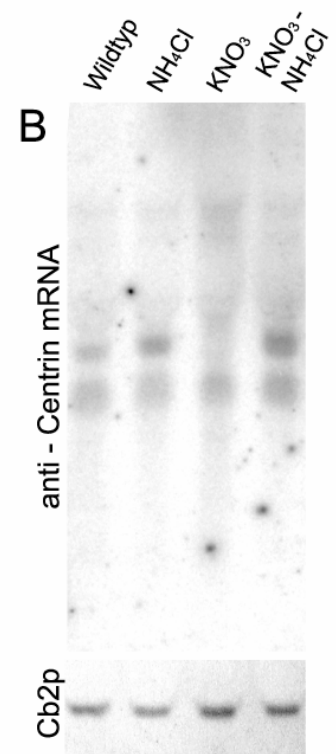
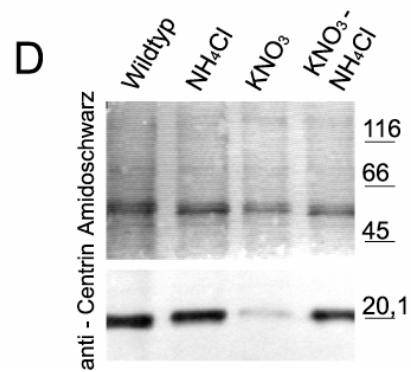
oben: Amidoschwarz-Färbung, unten: anti-Centrin-Färbung (pAK Cen1; 1:4000)

Die Markerbanden (in kDa) setzen sich aus den Größenstandards des "Low-Marker" (MWS-SDS-70L) und des "High Marker" (MWS-SDS-200) zusammen.



C

	Anzahl an Basalkörpern (%)						WT	Ø	n
	0	1	2	3	4	5			
Wildtyp							100	2	221
NH_4Cl			0,5				99,5	2	211
KNO_3	15,5	11	57,2	10,7	3,1	0,3	2,1	1,75	290
$\text{KNO}_3 - \text{NH}_4\text{Cl}$			0,5				99,5	2	206



9. Zeitlicher Ablauf des Abbaus des Centrinsystems nach der RNAi-Induktion

Abbildung 11 zeigt den Einfluss des RNAi induzierenden Konstruktes auf das Centrinsystem der Zellen während eines zeitlichen Verlaufes von sieben Tagen. Eine weitere Fluoreszenz ist nach 27 Tagen durchgeführt worden. Während die Stammkultur in ammoniumhaltigem Medium über diesen Zeitraum einen relativ stabilen Phänotyp von mindestens 96,6% Wildtypzellen (Abbildung 11 nach fünf Tagen) aufwies, fand in der induzierten Kultur ein stetiger Abbau des Centrinsystems statt.

Am 3. Tag nach dem Transfer in ammoniumfreies Medium wiesen 33,3% der Zellen einen RNAi-induzierten Phänotyp auf, der durch das Fehlen der centrinhaltigen Strukturen (NBBCs und distale Verbindungsfibrille) charakterisiert werden konnte. Am 7.Tag nach der Induktion wiesen 96,4% der Zellen einen RNAi-Phänotyp auf, 95,9% dieser Zellen besaßen aber auch weiterhin zwei Basalkörper (Abbildung 11A und B). Fast 80% der Zellen wiesen über diesen Zeitraum von sieben Tagen hinweg, unter induzierenden Bedingungen, auch weiterhin zwei Geißeln auf (Tabelle 5).

	Geißeln (%)				Ø	n
	0	1	2	3		
Tage nach Induktion						
2	3,3	7,0	88,9	0,7	1,87	273
3	4,7	11,4	83,6	0,3	1,80	343
4	2,4	7,6	89,5	0,5	1,88	210
5	4,5	6,25	89,3		1,85	224
6	6,7	9,2	84		1,77	238
7	11	8,5	79,5	1	1,7	200

Tabelle 5 : Übersicht über die Anzahl der Geißeln des Nit/RNAi-Stammes im zeitlichen Verlauf nach der Induktion des Promotors

Die Geißelzahlen wurden in lugolfixierten Zellen bestimmt.

Ø = durchschnittliche Geißelzahl pro Zelle, n = Anzahl der Zellen

Abbildung 11C zeigt Fluoreszenzaufnahmen, die den Abbau des Centrinsystems in den Zellgenerationen der ersten 7 Tage, nach der Induktion des Promotors darstellen. Am 3. Tag nach der Induktion war bereits eine deutliche Verminderung des centrinhaltigen Kernfasersystems zu erkennen (45,5% der Zellen bilden dieses nicht mehr korrekt aus). Der Anteil der Zellen ohne Kernfasersystem betrug am 4.Tag bereits 87,1%. Es fand zudem ein weiterer Rückgang der centrinhaltigen Strukturen statt, was durch eine Verkürzung bzw. durch das Fehlen der NBBCs und der distalen

Verbindungsfibrille charakterisiert wurde (Pfeile in Abbildung 11C, 4.Tag). Am 5.Tag war der Anteil der Zellen ohne Kernfasersystem bereits auf 94,2% gestiegen, 85,5% der Zellen bildeten keine NBBCs bzw. distalen Verbindungsfibrillen mehr aus. Das Fehlen von Centrin in der distalen Verbindungsfibrille resultierte in den Fluoreszenzaufnahmen in einer deutlichen Separation der beiden Basalkörper. Eine centrinhaltige Verbindung zwischen diesen (Pfeile in Abbildung 11C, 3. und 4. Tag), wie sie zuvor erkennbar war, konnte nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 11C, 5. und 6. Tag). EM-Aufnahmen anderer Centrin-RNAi-Stämme zeigten, dass die distale Verbindungsfibrille tatsächlich fehlte (ohne Abbildung). Der Prozentsatz der Zellen, in denen Centrin auf die Basalkörper beschränkt blieb, stieg am 6. Tag auf 93%. Eine fehlerhafte Anzahl an Basalkörpern konnte zu diesem Zeitpunkt nur in geringen Prozentzahlen detektiert werden. Dieser Ansatz bestätigte die Annahme, dass es unter RNAi-induzierenden Bedingungen zuerst zu einem Abbau der centrinhaltigen Strukturen der Zelle (Kernfasersystem, NBBCs und distale Verbindungsfibrille) kommt, bevor Effekte eintreten, die in einer erhöhten bzw. erniedrigten Basalkörperanzahl resultieren. Die Prozesse, die eine feste Anzahl an Basalkörpern pro Zelle garantieren bzw. Prozesse, die zur Reifung der vorhandenen Basalkörper und somit zur Ausbildung einer Geißel führen, konnten demnach während der ersten 6 Tage nach der Induktion des RNAi-Phänotyps korrekt ablaufen.

Abbildung 11: Abbau des Centrinsystems in den Zellgenerationen des Nit/RNAi-Stammes nach Induktion des Konstruktes

Der Nit/RNAi-Stamm wurde parallel unter induzierenden (KNO_3) und unter repressiven (NH_4Cl) Bedingungen kultiviert. Der Phänotyp der Zellen wurde täglich über einen Zeitraum von sieben Tagen in anti-Centrin-gefärbten (mAK BAS 6.8; 1:20) Immunfluoreszenzpräparaten bestimmt. Eine weitere Fluoreszenz wurde nach 27 Tagen durchgeführt.

WT= Wildtypphänotyp, RNAi= Phänotyp der centrindefizienten RNAi-Stämme, BK= Basalkörper, n= Anzahl der analysierten Zellen

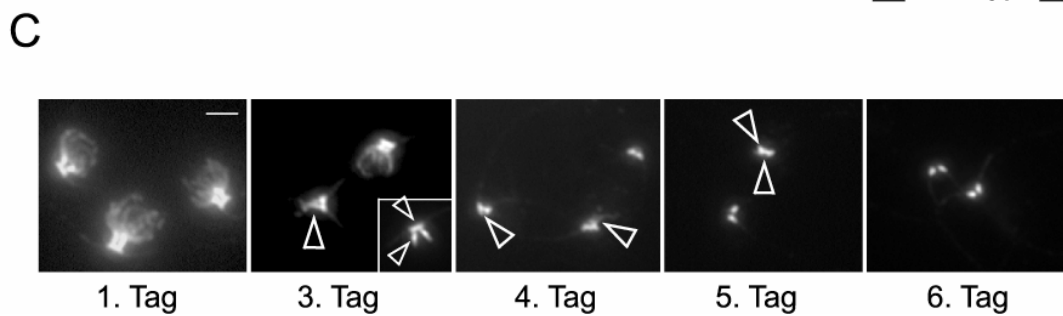
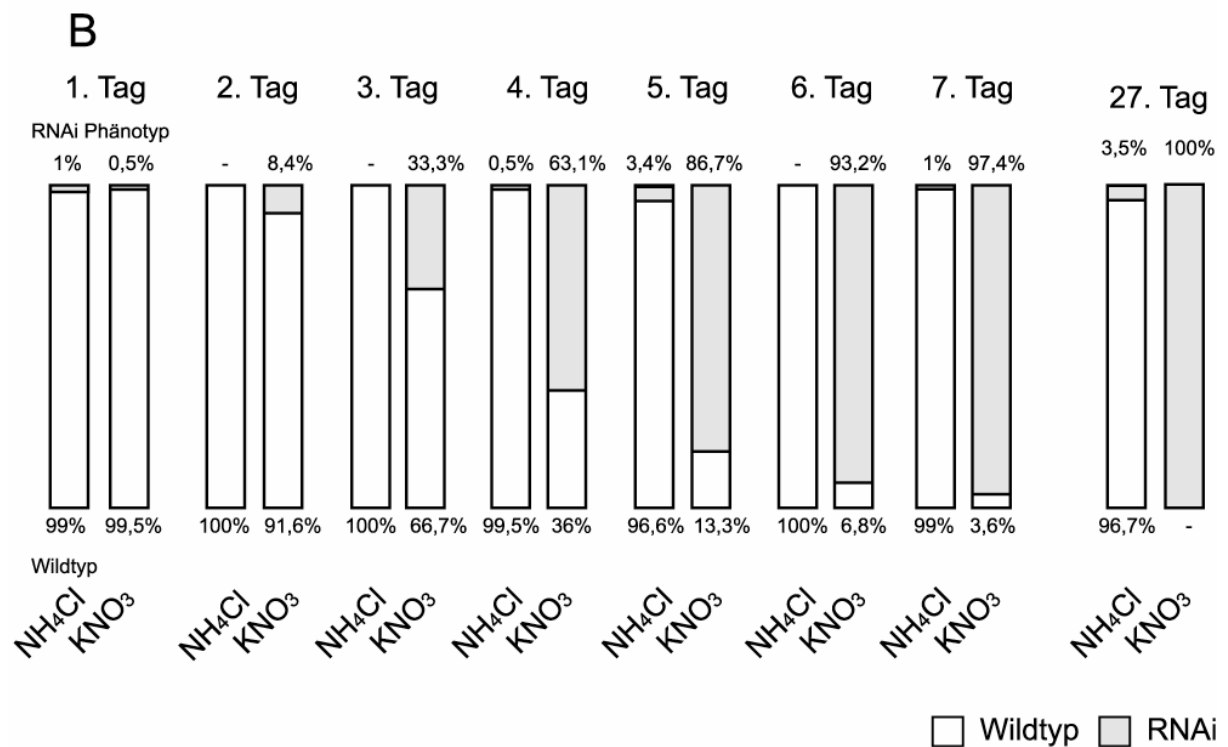
A: Tabellarische Übersicht über die Ausbildung des RNAi-Phänotyps nach Induktion des Konstruktes

B: Übersichtsdiagramm der unter A beschriebenen Ergebnisse

weißer Balken: Wildtypphänotyp, grauer Balken: Phänotyp mit Centrin-RNAi-Effekt

C: Immunfluoreszenzaufnahmen der tritonlysierten Nit/RNAi-Zellen unter induzierenden Bedingungen
Dargestellt sind anti-Centrin-gefärbte (mAK BAS 6.8; 1:20) Zellen des Stammes Nit/RNAi im Verlauf von sechs Tagen nach Induktion des Konstruktes. Die Pfeilspitzen in der Abbildung kennzeichnen die verkürzten (3. und 4. Tag) bzw. fehlenden (5. Tag) centrinhaltigen Strukturen (NBBCs und distale Verbindungsfibrille).

Phänotyp	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag	
	NH ₄ Cl	KNO ₃	NH ₄ Cl	KNO ₃	NH ₄ Cl	KNO ₃	NH ₄ Cl	KNO ₃
WT	99%	99,5%	100%	91,6%	100%	66,7%	99,5%	36%
RNAi	1% 2BK n= 203	0,5% 2BK n= 201	8,4% 2BK n= 211 n= 273		33,3% 2BK n= 209 n= 240		0,5% 2BK n= 206	63,1% 2BK 0,9% 4BK n= 222
Phänotyp	5. Tag		6. Tag		7. Tag		27. Tag	
	NH ₄ Cl	KNO ₃	NH ₄ Cl	KNO ₃	NH ₄ Cl	KNO ₃	NH ₄ Cl	KNO ₃
WT	96,6%	13,3%	100%	6,8%	99%	3,6%	96,7%	
RNAi	3,4% 2BK n= 207	86,7% 2BK n= 233	93,2% 2BK n= 250 n= 251		1% 2BK n= 202	95,9% 2BK 0,5% 3BK n= 195	1,5% 0BK 1,5% 2BK 0,5% 3BK n= 213	25% 0BK 7,4% 1BK 48,5% 2BK 19,1% >2BK n= 204



10. Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Inaktivierung des Konstruktes

Die in dieser Arbeit verwendeten RNAi-Stämme zeigten im Verlauf der Untersuchungen einen Rückgang des RNAi-Effektes und somit eine erneute Zunahme der Centrinexpression. Diese Beobachtung resultierte darin, dass die verwendeten RNAi-Stämme im Laufe eines Zeitraums von einigen Wochen bis Monaten erneut einen Wildtypphänotyp ausbildeten. Dies deutet darauf hin, dass das Konstrukt selbst abgeschaltet wurde. Im folgenden Teil dieser Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, die Einblicke in den Mechanismus des Prozesses, der zum Abschalten des Konstruktes führt, ermöglichen sollten.

Für die Grafik in Abbildung 12A wurde der Phänotyp der Zellen in RNAi- und Wildtyp-Phänotyp unterschieden. Als RNAi-Phänotyp bzw. als Zellen mit RNAi-Effekt wurden die Zellen bezeichnet, die keine centrinhaltigen Strukturen (NBBCs und distale Verbindungsfibrille) mehr ausbildeten. Die Stärke des RNAi-Effektes wurde über einen Zeitraum von 10 Monaten, vom Transformationstag beginnend, über Basalkörperzählungen und Westernblot verfolgt. Die Stämme, die hier verwendet wurden, trugen das RNAi-Konstrukt unter der Kontrolle des HSP70/rbcS2-Fusionspromotors (pCB740/RNAi). Sie wurden während dieses Versuches alle 7 bis 10 Tage auf 20.000 Zellen pro ml verdünnt und in regelmäßigen Abständen wurden Fluoreszenzpräparationen zur Bestimmung der durchschnittlichen Basalkörperzahl durchgeführt (Abbildung 12B).

Die Grafik in Abbildung 12A zeigt, anhand von vier RNAi-Stämmen, den zeitlichen Verlauf des Abschaltens des RNAi-Konstruktes über den prozentualen Anteil der Zellen mit RNAi-Phänotyp. Die beiden Stämme V G6 und V G4, die zu Beginn des Experimentes einen Phänotyp aufwiesen, der durch einen starken Centrinmangel ausgelöst wurde (57,8% bzw. 71% der Zellen ohne Basalkörper), bildeten bereits nach 75 Tagen den Wildtypphänotyp erneut aus (99% bzw. 97,2% Wildtypphänotyp). Bei den Stämmen V H8 und V H9, beide mit schwächeren RNAi-Effekt (93,3% bzw. 89,4% der Zellen mit zwei Basalkörpern), hingegen konnte zu diesem Zeitpunkt keine erhöhte Anzahl an Zellen mit Wildtypcharakter detektiert werden. Erst 261 Tage nach der Transformation stellte sich bei V H9 ein Phänotyp ein, der konstant über 50% Wildtypzellen aufwies (Abbildung 12B und C). Abbildung 12B gibt eine Übersicht zum Rückgang des RNAi-Effektes anhand der Stämme V H9 und V G6.

Der weitere Verlauf der Rückbildung des Wildtypphänotyps der Stämme V H9 und V H8 wurde in diesem Experiment nicht verfolgt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die ursprüngliche Stärke des RNAi-Effektes einen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Inaktivierung des Konstruktes hatte. Diese Beobachtungen wurden durch die Westernanalysen des Centrin-Proteingehaltes in den RNAi Stämmen V H9 und V G6 bestätigt (Abbildung 12D). In beiden Fällen konnte gezeigt werden, dass die Rückbildung des Wildtypphänotyps mit einem Anstieg der Centrinexpression einherging (Abbildung 12D). Darüber hinaus zeigen sowohl der Westernblot, wie auch die Basalkörperzählungen, dass die Ausbildung des Wildtypphänotyps auf einem Prozess basiert, der zu einem konstanten Rückgang des RNAi-Effektes über einen längeren Zeitraum hinweg führt. Die Beobachtungen, die während der Verwendung der anderen RNAi-Stämme im ersten Teil dieser Arbeit gemacht wurden, unterstützen diese Resultate.

Auch in dem Nit/RNAi Stamm fand, unter induzierenden Bedingungen, ein Verlust des RNAi-Effektes statt. Nach 211 Tagen wurde hier der Wildtypphänotyp mit einem Prozentsatz von 90,1 detektiert. Tabelle 6 gibt eine Übersicht über den Verlauf der Abschwächung des RNAi-Effektes in diesem Stamm.

		Basalkörperzahl (%)								
		0	1	2	3	4	5	WT		
Tage nach Induktion									n	
Kultivierung bei Dauerlicht ↓	26	26,1	11,8	51,6	6,8	3,1		0,6	1,5	161
	60	15,9	12,5	58,5	5,7	0,5		6,8	1,63	176
	95	8,8	3,1	77,7	7,3	1,2	0,4	1,5	1,9	260
	128	2,6	5,6	85	4,13	2,6			2	266
	155	2,2	0,9	92	1,8	0,4		2,6	1,97	291
	173	2,9	0,7	81,2	5,1			10,1	1,98	138
	211		0,4	8,6	0,9			90,1	2	232

Tabelle 6: Übersicht über den Verlust des RNAi-Effektes des Stammes Nit/RNAi unter induzierenden Bedingungen

Die Anzahl der Basalkörper wurde in anti-Centrin-gefärbten (mAK BAS 6.8; 1:20) Immunfluoreszenzpräparaten bestimmt. Beginnend mit dem 128. Tag nach der Induktion fand die Kultivierung zusätzlich unter Dauerlicht statt.

WT= Wildtypphänotyp, Ø= durchschnittliche Basalkörperzahl pro Zelle, n= Anzahl der analysierten Zellen

Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung des RNAi-induzierenden Konstruktes unter der Kontrolle des HSP70A/rbcS2-Fusionspromotors

A: Die Grafik zeigt die Rückbildung des Wildtypphänotyps anhand von vier RNAi-Stämmen über einen Zeitraum von ca. 300 Tagen

X-Achse: zeitlicher Verlauf in Tagen, Y-Achse: prozentualer Anteil der Zellen mit RNAi-Phänotyp

Die Stämme V G4 und V G6, mit ursprünglich starkem RNAi-Effekt, bildeten innerhalb eines Zeitraum von ca. 100 Tagen den Wildtypphänotyp in allen Zellen aus. In den Stämmen (V H8 und V H9), die zu Beginn der Untersuchungen einen milderen RNAi-Effekt zeigten, wiesen nach ca. 300 Tagen 50% der Zellen einen Wildtypphänotyp auf. Der Phänotyp der Zellen wurde in methanolfixierten und anti-centrin-gefärbten Immunfluoreszenzen (mAK BAS 6.8; 1:20) bestimmt.

B: Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Rückbildung des Wildtypphänotyps in den RNAi-Stämmen V G6 und V H9 anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen

oben: anti-centrin-Färbung (mAK BAS 6.8; 1:20) methanolfixierter Zellen des Stammes V G6 über einen Zeitraum von 68 Tagen, unten: anti-Centrin-gefärbte methanolfixierte Zellen des Stammes V H9 über einen Zeitraum von 160 Tagen

C: Durchschnittliche Basalkörperzahlen der RNAi-Stämme V G6 und V H9 über einen Verlauf von 75 bzw. 308 Tagen

Die Basalkörperzahlen wurden in mAK BAS 6.8-gefärbten Fluoreszenzpräparaten (1:20) bestimmt.

Ø= durchschnittliche Basalkörperzahl; n= Anzahl der zur Auswertung eingesetzten Zellen; WT= Wildtypphänotyp

D: Westernblots der Stämme V G6 (oben) und V H9 (unten)

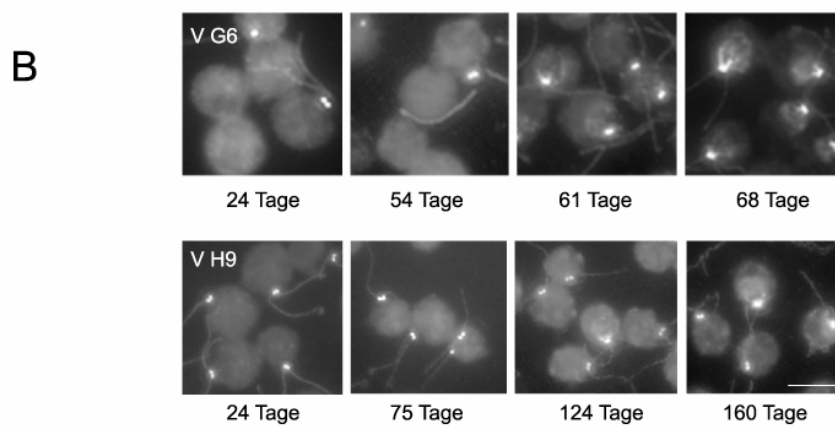
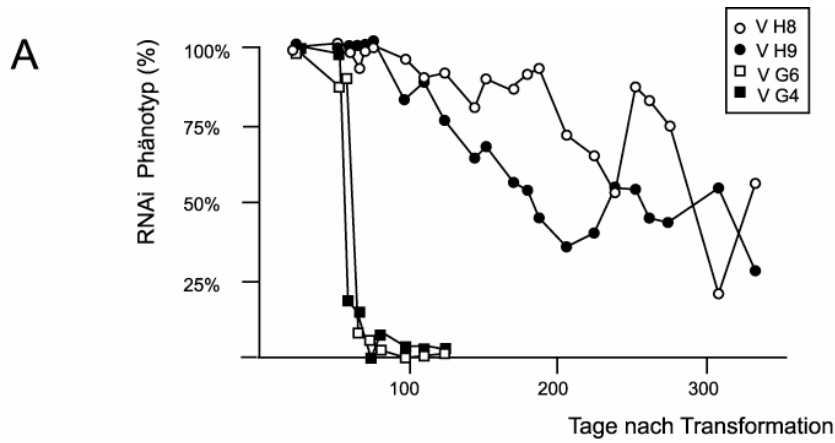
oben: Westernblot des RNAi-Stammes V G6, die Proben entsprechen einem Zeitraum von 75 Tagen

unten: Westernblot des Stammes V H9 über einen Zeitraum von 207 Tagen

25 µg Gesamtprotein des Pellets der tritonlysierten Zellen wurde über eine 12,5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

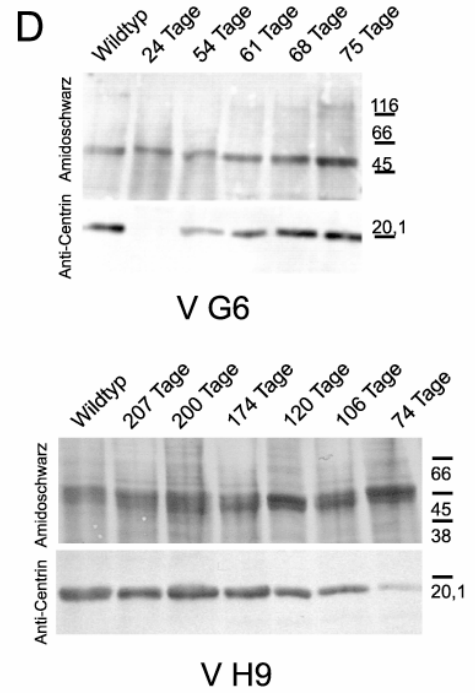
obere Hälfte des Blots: Amidoschwarz-Färbung, untere Hälfte des Blots: anti-Centrin-Färbung (pAK Cen1; 1:4000)

Die Markerbanden (in kDa) setzen sich aus den Größenstandards des "Low-Markers" (MWS-SDS-70L) und des "High Markers" (MWS-SDS-200) zusammen.



C

Tage nach Transformation	Basalkörperzahl (%)						WT	n
	0	1	2	3	4	5		
V G6	57,8	6,7	26,9	4,9	2,7	0,9	11,9	223
54	44,6	7,9	31,7	3,5	0,5		9	202
61	0,4		90,1	0,4			91,3	233
68	0,9		7,8				1,98	219
75			6,6				93,4	227
V H9	5,1	0,4	89,4	4,7	0,4		1,93	235
60	3,6	1,9	90,1	3,6			1,2	153
81	8,2	5,9	87,4	6,3		1,1	1,80	269
109	14,6	5,4	64,0	3,3		0,8	11,7	239
143		1	53,9	1			45,1	204
224			40,2				59,8	179
252			51,7	2,2			46,1	178
261			45,9				54,9	182
273			44				56	125
308			47,8	0,8			55,4	130



11. PCR-Ansätze zum Nachweis des Konstruktes in der genomischen DNA der inaktiven RNAi-Stämme

Um auszuschließen, dass der Rückgang des RNAi-Effektes mit dem Verlust der im Genom integrierten Konstruktkopie einhergeht, wurden für einige exemplarische Stämme PCR-Ansätze gegen genomische DNA durchgeführt. Als Vorlage diente in diesen Ansätzen DNA aus RNAi-Stämmen, in denen der Wildtypphänotyp vollständig wiederhergestellt war. Die PCR-Ansätze wurden gegen die RNAi-Stämme I A7, I A10, II N41 und V G6 durchgeführt. Darüber hinaus wurde auch eine PCR gegen genomische DNA des Stammes Nit/RNAi durchgeführt, der unter induzierenden Bedingungen den Wildtypphänotyp erneut ausbildete. In allen Fällen konnte das Konstrukt weiterhin in voller Länge nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

12. Bestimmung des Methylierungsgehaltes des ausgeschalteten Konstruktes

In *Chlamydomonas reinhardtii*, wie in vielen anderen Organismen auch, ist die Methylierung bestimmter Sequenzbereiche als Möglichkeit zur Regulierung der Genaktivität gegeben (Zhang et al., 2002). Methylierungen der Cytosine in Promotorbereichen wurden z.B. in Pflanzen als Ursache zur Inhibierung der Transkription nachgewiesen (Aufsatz et al., 2002; Mette et al., 2000). Aufgrund dessen sollte im Folgenden in exemplarischen RNAi-Stämmen, die im Genom integrierte, aber ausgeschaltete Kopie des RNAi-induzierenden Konstruktes auf Methylierungen untersucht werden. Stämme, die die aktive Form des RNAi-induzierenden Vektors trugen und somit einen RNAi-Effekt aufwiesen, werden im Folgenden als z.B. „I A7 aktiv“ bzw. „Nit/RNAi aktiv“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu werden die Stämme, die die ausgeschaltete Form des Vektors trugen und somit keinen RNAi-Effekt mehr aufwiesen, als z.B. „I A7 inaktiv“ bzw. „Nit/RNAi inaktiv“ bezeichnet.

Da durch das Restriktionsenzym *HpaII* nur die unmethylierte Sequenz CCGG, nicht aber die methylierte Form erkannt und geschnitten wird, kann so das Methylierungsmuster für bestimmte Sequenzbereiche bestimmt werden. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse des Southernblots für den Nit/RNAi-Stamm dargestellt. Isolierte DNA des Wildtyps und des unter nicht induzierenden Bedingungen kultivierten Stammes Nit/RNAi aktiv, sowie des unter induzierenden Bedingungen

kultivierte Stamm Nit/RNAi inaktiv, wurden mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *HindIII* bzw. *PstI*, *HindIII* und *HpaII* verdaut. *PstI* schneidet unmittelbar vor Beginn des Promotors, während *HindIII* am Ende des Promotors schneidet. Somit konnte der Promotor als deutliche Bande von ca. 1100 bp separiert werden (Abbildung 13B, Nit/RNAi aktiv und Nit/RNAi inaktiv, 1. Spur). Beide Schnittstellen wurden über die Primer während der Klonierung des Konstruktes eingefügt und kommen in der Wildtypkopie des Promotors nicht vor (vgl. Abbildung 13B, Wildtyp, Nit/RNAi aktiv und Nit/RNAi inaktiv, obere Bande 1. Spur). Als Sonde wurde für diesen Southernblot das DIG-markierte *HindIII/PstI*-Fragment des Promotors verwendet. Die vier potentiellen Methylierungsstellen im Promotorbereich sind in Abbildung 13A schematisch dargestellt. Der zusätzliche *HpaII*-Verdau der DNA zeigte einen Abbau des Promotorfragmentes im Gel, ein Indikator dafür, dass keine Methylierungen im Promotorbereich vorlagen (Abbildung 13B, Nit/RNAi aktiv und Nit/RNAi inaktiv 2. Spur). Die, nach dem *HpaII*-Verdau entstandenen Fragmente waren in diesem Southernblot nicht nachweisbar.

Für den Southernblot in Abbildung 13C wurden die Proben mit den Restriktionsenzymen *SacI* bzw. *SacI* und *HpaII* verdaut. Das *SacI*-Fragment des Nit/RNAi-Konstruktes wies eine Größe von 1030 bp auf und setzte sich aus dem zweiten Teil des Promotorbereiches (ca. 450 bp), dem RNAi-induzierenden Konstrukt (330 bp) und der Terminationssequenz der RubisCo (ca. 250 bp) zusammen (Abbildung 13A). Im längeren Fragment des RNAi induzierenden Konstruktes befindet sich eine *HpaII*-Schnittstelle, die am Ende des 1. Introns liegt. Da weder das 1. Exon der kodierenden Sequenz von Centrin, noch die Terminationssequenz der RubisCo CCGG-Sequenzen beinhalten, handelt es sich hier um die einzige mögliche CG-Methylierungsstelle im Konstrukt (vgl. Abbildung 13A). Als Sonde wurde für diesen Southernblot das DIG-markierte *HindIII-EcoRI*-Fragment, bestehend aus dem kürzeren Fragment des RNAi-induzierenden Konstruktes und der Terminationssequenz der RubisCo, verwendet. In der jeweils 2. Spur der Proben Nit/RNAi aktiv und Nit/RNAi inaktiv in Abbildung 13C zeigte sich auch hier ein Abbau des Fragmentes, welches dem Konstrukt entsprach (Pfeile in Abbildung 13C). Die *HpaII*-Schnittstelle lag somit auch hier unmethyliert vor. Der Vergleich der Banden mit einem Größenstandard ergab für das *SacI*-Fragment des Nit/RNAi-Konstruktes eine Größe von 1000 bp, für die entstandenen Fragmente des *HpaII*-Verdaus die Größe von 500 bzw. 400 bp (errechnete Größe: 650 und 380 bp).

Das Methylierungsmuster der RNAi-Stämme, die das RNAi induzierende Konstrukt unter der Kontrolle des HSP70A/rbcS2-Fusionspromotors trugen, wurde exemplarisch an dem Stamm I A7 getestet (Abbildung 13D). Auch dieser wies zum Zeitpunkt der DNA Isolierung keinen RNAi-Effekt mehr auf. Verdaut wurde die DNA mit den Restriktionsenzymen *XbaI* bzw. *XbaI* und *HpaII*. *XbaI* schneidet im Anfangsbereich des Promotors. Dieser besitzt zwei potentielle Methylierungsstellen (ca. 280 bp bzw. 350 bp nach der *XbaI* Schnittstelle), zusätzlich zu der bereits beschriebenen Methylierungsstelle des Konstruktes. Als Sonde wurde hier das DIG-markierte *XbaI-HindIII*-Fragment des Konstruktes verwendet, welches den Promotor und den längeren Arm des RNAi-Konstruktes beinhaltet. Auch in diesem Ansatz führte der zusätzliche *HpaII*-Verdau zu einem Abbau des nachgewiesenen Fragmentes. Es konnten somit auch in dem Stamm I A7 inaktiv keine Methylierungen im RNAi-induzierenden Konstrukt nachgewiesen werden.

Das Ausschalten des RNAi-induzierenden Konstruktes ist demnach in diesen Stämmen nicht auf Methylierungen in CCGG-Bereichen des Promotors bzw. des Konstruktes zurückzuführen.

Abbildung 13: Southernblots zur Bestimmung des Methylierungsgrades der inaktivierten RNAi-induzierenden Konstrukte

Für die dargestellten Southernblots wurden jeweils ca. 25 µg genomische DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, über 1,5%ige Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert. Als Größenstandard diente der "1 kb Plus DNA Ladder" (Life-Technologies, GIBCO BRL®). Die jeweilige Sonde, die für das Nachweisverfahren eingesetzt wurde, ist neben den entsprechenden Blots schematisch dargestellt.

A: Skizze des Nit/RNAi-Konstruktes

Dargestellt sind die Restriktionsschnittstellen, die für den Verdau der genomischen DNA bzw. für die Präparation der Sonde verwendet wurden. Die *HpaII*-Schnittstellen sind die potentiellen CCGG-Methylierungssequenzen des Promotors bzw. des Konstruktes.

B: Southernblot zum Nachweis von Methylierungen im Promotorbereich des Nit/RNAi-Konstruktes

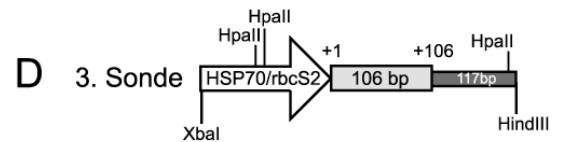
Die genomische DNA der Kontrolle bzw. des aktiven und inaktiven Nit/RNAi-Stammes wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII*, *PstI* bzw. *HindIII*, *PstI* und *HpaII* verdaut. Als Sonde wurde für diesen Blot das DIG-markierte *PstI-HindIII*-Fragment des Vektors Nit/RNAi verwendet (Skizze). Der Pfeil kennzeichnet das, durch diese Sonde detektierte, Promotorfragment. Ein *HpaII*-Verdau führt zu einem Abbau des Fragmentes.

C: Southernblot zum Methylierungsnachweis im Konstruktbereich des Nit/RNAi-Konstruktes

Die genomische DNA der, unter B beschriebenen Stämme, wurde für diesen Blot mit den Restriktionsenzymen *SacI* bzw. *SacI* und *HpaII* verdaut. Als Sonde wurde das DIG-markierte *HindIII-EcoRI*-Fragment des Vektors Nit/RNAi eingesetzt. Die Pfeile kennzeichnen das *SacI*-Fragment des Konstruktes sowie die, nach einem *HpaII*-Verdau entstandenen Fragmente.

D: Southernblot zum Nachweis von Methylierungen im RNAi-Konstrukt unter der Kontrolle des HSP70A/rbcS2-Fusionspromotors

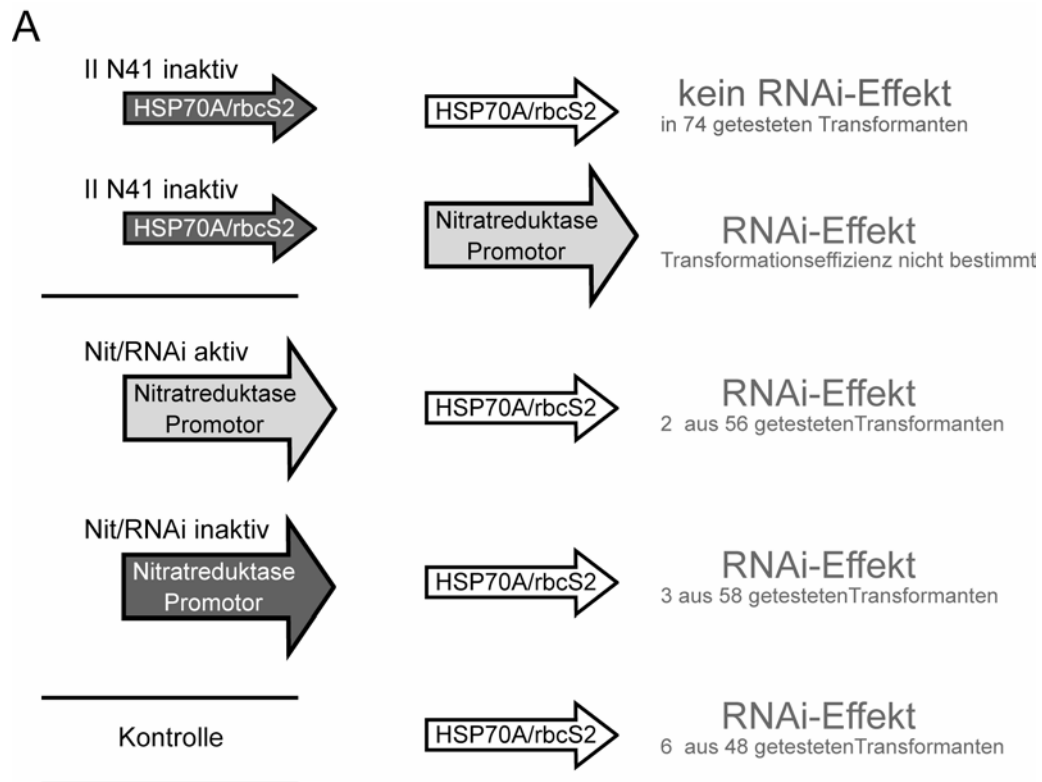
Die genomische DNA des Stammes I A7 und des Kontrollstammes wurden mit den Restriktionsenzymen *XbaI* bzw. *XbaI* und *HpaII* verdaut. Als Sonde diente hier das *XbaI-HindIII*-Fragment des Vektors pCrGFP/RNAi. Auch hier konnte ein Abbau des *XbaI-HindIII*-Fragmentes durch einen zusätzlichen *HpaII*-Verdau nachgewiesen werden.



13. Einfluss des Konstruktaufbaus auf den Prozess der Inaktivierung

Einblicke in den Einfluss des Konstruktaufbaus auf den abschaltenden Mechanismus des RNAi-induzierenden Konstruktes sollte ein Transformationsversuch ermöglichen. Hierzu wurden die inaktiven RNAi-Stämme mit dem RNAi-induzierenden Konstrukt, unter der Kontrolle des jeweils anderen Promotors transformiert. Inwieweit diese Modifikation des RNAi-induzierenden Konstruktes zu einer erneuten Ausbildung des RNAi-Phänotyps führte, wurde über anti-Centrin gefärbte Immunfluoreszenzen ermittelt.

Sowohl der aktive, wie auch der inaktive Nit/RNAi-Stamm wurden erneut mit dem RNAi-induzierenden Konstrukt transformiert, welches jedoch unter der Kontrolle des HSP70A/rbcS2-Fusionspromotors (pCB740/RNAi; vgl. Abbildung 1) stand. Zusätzlich wurde der inaktive RNAi-Stamm II N41, der bereits eine abgeschaltete Kopie des pCB740/RNAi-Konstruktes trug, erneut mit diesem transformiert. Um die Effizienz dieser Transformation zu bestimmen, wurde auch ein Kontrollstamm mit dem pCB740/RNAi-Konstrukt transformiert. Alle Transformationen wurden als Kotransformationen mit dem Vektor pMS171 durchgeführt. Abbildung 14 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Transformationen und deren Ergebnisse wieder.



B

	100% RNAi-Phänotyp	>40% RNAi-Phänotyp	n
Nit/RNAi aktiv	2	—	56
Nit/RNAi inaktiv	1	2	58
II N41 inaktiv	—	—	74
Kontrolle	3	3	48

Abbildung 14: Kreuztransformation zur Ermittlung der Sequenzspezifität des Prozesses, der zum Ausschalten der Konstrukte führte

Die inaktiven RNAi-Stämme II N41 und Nit/RNAi wurden sowohl mit dem pCB740/RNAi-Vektor, als auch mit dem Nit/RNAi-Vektor transformiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden ein Kontrollstamm und der aktive, jedoch nicht induzierte Nit/RNAi-Stamm verwendet. Der Phänotyp der Transformanten wurde in anti-Centrin-gefärbten (mAK BAS 6.8;) Fluoreszenzpräparationen bestimmt.

A: Schematische Darstellung der Kreuztransformationen

Die inaktiven Promotoren sind in Dunkelgrau dargestellt, die aktiven Promotoren in Weiß (HSP70/rbcS2) bzw. Hellgrau (Nitratreduktase-Promotor). Die Effizienz der Transformation ist angegeben.

B: Tabellarische Darstellung der Kreuztransformationen

Mit „100%-RNAi-Phänotyp“ wurden transformierte Zelllinien bezeichnet, die in allen Zellen einen centrindefizienten Phänotyp ausbildeten. Mit „>40% RNAi-Phänotyp“ wurden Stämme deklariert, in denen mindestens 40% der Zellen einen RNAi-Phänotyp aufwiesen.

Nit/RNAi aktiv= Nit/RNAi-Stamm, der unter nicht induzierenden Bedingungen kultiviert wurde, Nit/RNAi inaktiv= Nit/RNAi-Stamm, der unter induzierenden Bedingungen kultiviert wurde und keinen centrindefizienten Phänotyp mehr ausbildete, II N41 inaktiv= ehemals centrindefizienter RNAi-Stamm; n= Anzahl der getesteten Transformanten

Die Effizienz der Transformation des Kontrollstammes mit dem pCB740/RNAi-Vektor lag bei 12,5% (6 aus 48 getesteten Stämmen, vgl. Abbildung 14). 2 aus 56 Kolonien des Nit/RNAi-Stammes, der unter repressiven Bedingungen kultiviert wurde (Nit/RNAi aktiv), wiesen nach der Transformation einen centrindefizienten Phänotyp auf (Abbildung 14). In beiden Kontrollansätzen konnten somit Transformanten mit einem RNAi-induzierten Phänotyp detektiert werden. Des weiteren konnte auch in 3 von 58 Klonkolonien des inaktiven Nit/RNAi-Stammes, nach der Transformation erneut eine Verminderung der Centrinexpression festgestellt werden. Sowohl in dem Kontrollansatz, wie auch in den Nit/RNAi-Ansätzen, fand demnach eine Expression des neu integrierten Konstruktes statt (Abbildung 14A und B). Die wiederholte Integration des bereits ausgeschalteten Konstruktes in den Stamm II N41 führte zu keinem nachweisbaren Effekt, was darauf hindeutet, dass das Konstrukt unmittelbar nach der Integration in das Genom abgeschaltet wurde (Abbildung 14A). Eine Transformation des RNAi-Stammes II N41 mit dem Nit/RNAi-Konstrukt wiederum führte zu Transformanten, die unter induzierenden Bedingungen einen Centrin-RNAi-Phänotyp ausbildeten (Abbildung 14A). Dies bestätigt die Annahme, dass der Austausch des Promotors das RNAi-induzierende Konstrukt ausreichend verändert, um durch den Mechanismus, der zum Ausschalten des Konstruktes führt, nicht beeinträchtigt zu werden.

Der Promotor des Nit/RNAi-Konstruktes ist ein in *Chlamydomonas reinhardtii* natürlich vorkommender Promotor, der die Expression der Nitratreduktase unter ammoniumfreien Bedingungen kontrolliert (vgl. III.7). Unter diesen Bedingungen ist die Expression der Nitratreduktase essentiell. Der Nit/RNAi-Stamm war auch nach dem Abschalten des Nit/RNAi-Konstruktes noch unter diesen Bedingungen kultivierbar. Die endogene Kopie des Promotors war demnach weiterhin aktiv und ermöglichte die Expression der Nitratreduktase. Das Abschalten blieb somit auf das RNAi-induzierende Konstrukt beschränkt, ohne die Aktivität des identischen Promotors zu beeinflussen. Auch in den zuvor beschriebenen RNAi-Stämmen, die zusätzlich GFP-SFA exprimierten (vgl. III.5), blieb der Mechanismus des Abschaltens auf das RNAi-induzierende Konstrukt beschränkt. Die Expression des GFP-SFA, die durch eine identische Kopie des HSP70A/rbcS2-Fusionspromotor gesteuert wurde, blieb unverändert.

14. Untersuchungen zur Dauerhaftigkeit des Verlustes des RNAi-Effektes unter repressiven Bedingungen

In Nit/RNAi-Stämmen, die unter repressiven Bedingungen kultiviert wurden, fand keine Transkription des RNAi-induzierenden Konstruktes statt. Inwieweit das inaktive Nit/RNAi-Konstrukt unter diesen Bedingungen dauerhaft abgeschaltet bleibt, wurde in diesem Experiment untersucht. Hierzu wurde eine inaktive Nit/RNAi-Kultur in ein ammoniumhaltiges Medium transferiert. Die Dauer der Inaktivierung des Konstruktes wurde durch erneute Induktion dieses Stammes über eine längere Zeitspanne getestet. Auch hier wurde das Ergebnis über anti-Centrin-gefärbte Immunfluoreszenzaufnahmen ermittelt. Das Flussdiagramm in Abbildung 15 gibt eine Übersicht über den Versuchsablauf und die Ergebnisse.

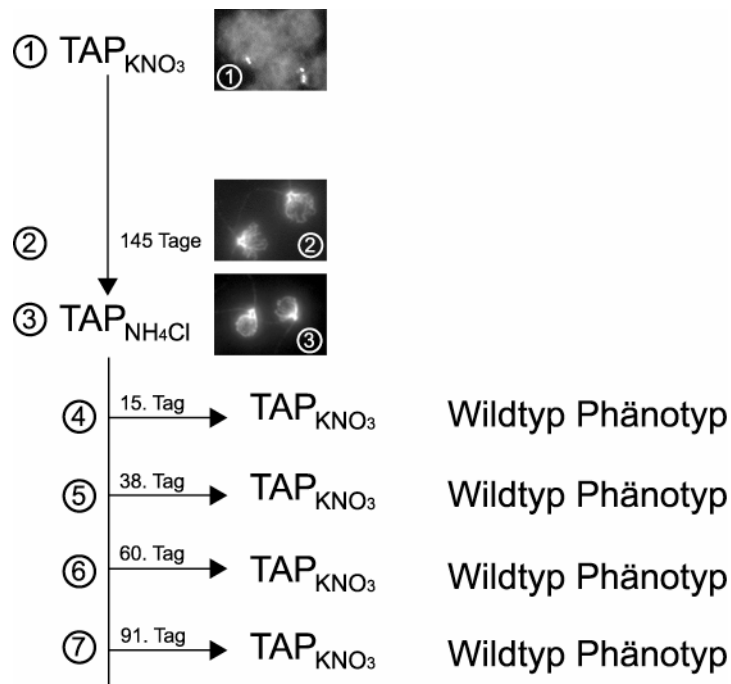


Abbildung 15: Versuche zur Haltbarkeit des Signals, welches unter induzierenden Bedingungen zum Verlust des RNAi-Effektes führte

Der Nit/RNAi-Stamm wurde solange unter induzierenden Konditionen kultiviert (1. Aufnahme), bis ein vollständiger Verlust des RNAi-Effektes dokumentiert werden konnte (2. Aufnahme). Darauf folgend wurde die Kultur in ammoniumhaltiges TAP transferiert (3. Aufnahme). Die erneute Induktion dieser Kultur nach 15, 38, 60 und 91 Tagen zeigte keinen Effekt auf den Wildtypphänotyp.

Die Fluoreszenzbilder zeigen anti-Centrin-gefärbte (mAK BAS 6.8; 1:20) Nit/RNAi-Cytoskelette.

TAP_{KNO₃} = TAP mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle, TAP_{NH₄Cl} = TAP mit Ammonium

Nach 15 bis 91 Tagen wurde dieser, unter repressiven Bedingungen kultivierte inaktive Nit/RNAi-Stamm, in ein ammoniumfreies Medium transferiert. In allen vier Ansätzen konnte keine Induktion des RNAi-Effektes nachgewiesen werden. Die Zellen des Stammes bildeten weiterhin den Wildtypphänotyp aus (Abbildung 15). Das Abschalten des RNAi-induzierenden Konstruktes blieb somit auch unter nicht induzierenden Bedingungen über einen längeren Zeitraum erhalten.

IV. Diskussion

A) Analyse der Centrifunktionen über einen centrindefizienten Phänotyp

Im ersten Teil dieser vorliegenden Arbeit wurden die Funktionen Centrins in *Chlamydomonas reinhardtii* durch die Inhibierung der Centrinexpression über "RNA interference" analysiert. Die Isolierung von Transformanten mit einem variierenden Gehalt an restlichem Centrin in den Zellen, ließ Schlüsse über die unterschiedliche Sensitivität der vielfältigen Funktionen Centrins zu.

Design des RNAi-induzierenden Vektors

Die Arbeiten von Smith et al. (2000) zum Design eines RNAi-induzierenden Vektors für Pflanzenzellen ergaben, dass ein RNA-Transkript, bei dem die komplementären Arme durch ein funktionales Intron unterbrochen sind, die höchste Effizienz zeigt. Weitere Studien über RNAi-induzierende Konstrukte legen nahe, dass auch das Vorhandensein einer Polyadenylierungsstelle die Effizienz des Mechanismus steigert (Reed und Hurt, 2002). Das Vorkommen dieser Sequenzbereiche im primären Transkript ermöglicht wahrscheinlich das Einschleusen dieser in die Wege der mRNA-Prozessierung. Der Transport des modifizierten Transkriptes in das Cytosol der Zellen wird durch diese Wege garantiert und kann so effektiv den Abbau der Ziel-mRNA einleiten (Cerutti, 2003).

Angelehnt an diese Studien wurde in dieser Arbeit zur Induktion des RNAi-Mechanismus in den Zellen von *Chlamydomonas reinhardtii* ein solcher Vektor konzipiert. Die beiden komplementären Bereiche der centrin codierenden Sequenz werden hier durch das 1. Intron des Centringens unterbrochen (vgl. Abbildung 1; III. Ergebnisse). Durch die Prozesse des Splicens entsteht so aus der "hair-loop"-Struktur des RNA-Transkriptes ein doppelsträngiges RNA-Fragment von ca. 106 bp. Das induzierende Konstrukt wurde vor die Terminationssequenz der RubisCo kloniert und besitzt demnach eine Polyadenylierungsstelle (Fuhrmann et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde ein relativ kurzer Bereich der kodierenden Region Centrins zur Inhibierung der Expression gewählt. Die Ursache hierfür liegt in der hohen Homologie Centrins zu Calmodulin. Da lediglich die N- und C-terminalen Bereiche des Centringens eine erhöhte Variabilität der Sequenz aufweisen, mussten relativ

kurze Sequenzbereiche zur Klonierung des Hybridkonstruktes eingesetzt werden. Darüber hinaus ist für effektives "RNA-silencing" ein Bereich von 50-100 bp nach dem Starkodons gut geeignet (Elbashir et al., 2002). In diesem Fall wurde der Genbereich, der der N-terminale Proteindomäne entspricht, gewählt.

Durch die Transformation von *Chlamydomonas reinhardtii* mit diesem RNAi-induzierende Vektor konnten Klonkolonien isoliert werden, deren Centringehalt bis zu ca. 95% reduziert war. Die Deletion des Centrinpromotors in *Chlamydomonas reinhardtii* ist letal (Dutcher, 2003), so dass RNAi eine gute Möglichkeit bietet die Reaktion der Zellen auf den Centrinmangel zu untersuchen.

Funktionsanalysen Centrins anhand des centrindefizienten Phänotyps in vfl2-Zellen und in den Zellen der RNAi-Stämme

Bislang wurden Einblicke über die Auswirkungen eines verringerten Centringehaltes in den Zellen und somit über die Funktion Centrins in *Chlamydomonas reinhardtii* durch die Mutante vfl2 gewährt (vgl. auch I. Einleitung). Dieser Stamm trägt eine Punktmutation im Centringen, welche in einem Basenaustausch an Position 101 resultiert (Taillon et al., 1992). An dieser Position befindet sich im Wildtypgen eine in der Familie der EF-Hand-Proteine hoch konservierte Glutaminsäure, die den aminoterminalen Start der E-helix der dritten EF-Hand darstellt (Kretsinger, 1987). Es wird angenommen, dass diese E-helix an der Ausbildung der Proteinstruktur maßgeblich beteiligt ist. In dem mutierten Gen des Stammes vfl2 befindet sich an Position 101 anstelle der Glutaminsäure die Aminosäure Lysin (Taillon et al., 1992). Dieser Aminosäurenaustausch resultiert wahrscheinlich in einer fehlerhaften Ausbildung der Tertiärstruktur Centrins (Taillon and Jarvik, 1995). Der vfl2-Phänotyp lässt sich eventuell auch auf eine Beeinträchtigung der Phosphorylierung Centrins zurückführen, da in unmittelbarer Nähe zu Position 101 eine potentielle Phosphorylierungsstelle Centrins liegt (Taillon et al., 1992).

Der Phänotyp der Mutante vfl2 zeichnet sich durch eine verringerte Centrinkonzentration in den Zellen und ein Fehlen der centrinhaltigen Strukturen (distale Verbindungsfibrille, NBBCs und Übergangsregion zwischen Basalkörper und Axonema) aus. Zudem besitzen die Zellen eine variable Anzahl an Basalkörpern bzw. Geißeln (Kuchka und Jarvik, 1982; Wright et al., 1985). Während die vfl2-Zellen 20-25% der Centrinmenge des Wildtyps besitzen (Wright et al., 1989), findet in den RNAi-Stämmen dieser Arbeit eine Verminderung des Centringehaltes um bis zu 95%

der ursprünglichen Menge statt. Die Zellen der Centrin-RNAi-Stämme bilden, - ebenso wie in *vfl2* - einen Phänotyp aus, der durch eine variable Anzahl an Basalkörpern bzw. Geißeln, sowie durch das Fehlen der centrinhaltigen Strukturen gekennzeichnet ist. Im Gegensatz zu *vfl2*-Zellen konnte in den RNAi-Stämmen, die einen geringen restlichen Centringehalt aufwiesen (z.B. I A10 und II N41), eine drastische Verringerung der Basalkörper- bzw. Geißelzahl und das Vorkommen von unbegeißelten Basalkörpern detektiert werden. Weiterhin wurden Effekte, wie die polyzentrische Organisation des mikrotubulären Cytoskeletts, Fehlbildungen der mikrotubulären und fibrillären Geißelwurzeln sowie eine erhöhte Anzahl an mehrkernigen Zellen beobachtet. *Vfl2*- und RNAi-Zellen zeigen demnach Unterschiede im Phänotyp.

Der Phänotyp der *vfl2*-Zellen wird wahrscheinlich durch eine veränderte Struktur Centrins oder durch das Fehlen einer Phosphorylierungsstelle hervorgerufen. In beiden Fällen müssen die verschiedenen Funktionen Centrins durch die Punktmutation des Proteins nicht gleichermaßen beeinflusst werden. Revertanten des *vfl2*-Stammes, die entweder Methionin oder Isoleucin Reversionen an Position 101 aufweisen, bilden beispielsweise erneut normale NBBCs und Übergangsregionen aus. Sie besitzen aber weiterhin gestörte distale Verbindungsfibrillen (Taillon et al., 1992; Taillon und Jarvik, 1995). Auch in Hefe konnte gezeigt werden, dass einige Punktmutationen im *cdc31*-Gen (ein centrinhomologes Protein) die Prozesse der SPB-Duplikation nicht beeinflussen, während Punktmutationen an anderen Stellen des Gens diese inhibieren (Ivanovska und Rose, 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine veränderte Form Centrins einige Funktionen des Proteins blockieren kann, ohne dass alle Funktionen gleichermaßen betroffen sind. Der Phänotyp der Centrin-RNAi-Stämme ist auf eine verminderten Centrinexpression zurückzuführen. Die Isolierung von Transformanten mit einem unterschiedlichen Gehalt an restlichem Centrin ermöglichte es darüber hinaus, die Sensitivität der unterschiedlichen Funktionen bezüglich der verminderten Centrinkonzentration zu untersuchen. Die Expression des RNAi-induzierenden Konstruktes war nicht stabil und der Wildtypphänotyp wurde in allen RNAi-Stämmen im Laufe der Zeit wieder ausgebildet. So konnte für diese Stämme eine Beeinträchtigung des endogenen Gens wie z. B. durch homologe Rekombination oder Insertionsmutagenese ausgeschlossen werden.

Die Funktionen Centrins während den Prozessen der Mitose, sowie der Einfluss Centrins auf die korrekte Aufteilung der Basalkörper

In Wildtypzellen von *Chlamydomonas reinhardtii* sind die Basalkörper während der Mitose mit den Spindelpolen assoziiert (Pickett-Heaps, 1970; Coss, 1974). Diese Assoziation wurde als ein Kontrollmechanismus der korrekten Aufteilung der Basalkörper in die Tochterzellen postuliert (Wright et al., 1989). Da in vfl2-Zellen eine variable Anzahl an Basalkörpern pro Zelle detektiert wurde, scheint dieser Aufteilungsmechanismus gestört zu sein. Als Ursache hierfür wurde das Fehlen der centrinhaltigen Verbindungen zwischen Basalkörper und Kern (NBBCs) angenommen (Wright et al., 1989; Marshall et al., 2001).

In keinem der hier analysierten RNAi-Stämme konnte die Existenz von NBBCs durch Immunfluoreszenzpräparationen bzw. durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden. In dem RNAi-Stamm I A7 konnte z.B. eine erhöhte Instabilität der Cytoskelette detektiert werden. In ca. 30% der Fällen war der Kern von dem Basalapparat getrennt. Diese Beobachtung ist durch das Fehlen der NBBCs zu erklären (diese Untersuchungen wurden von Jutta Schoppmeier durchgeführt, siehe auch Koblenz et al., 2003). Dennoch wiesen 94,5% der I A7 Zellen zwei Basalkörper auf. Die korrekte Basalkörperaufteilung während der Mitose wurde in diesem Stamm demnach nur geringfügig beeinflusst. Somit widersprechen die Ergebnisse dieser Arbeit der Annahme, dass die NBBCs eine essentielle Funktion während der Prozesse der Basalkörpersegregation ausüben. Gestützt werden diese Ergebnisse durch mitotische Beobachtungen eines Centrin-GFP exprimierenden Stammes. Ruiz-Binder et al. (2002) konnten zeigen, dass eine erhöhte Expression von GFP-Centrin in *Chlamydomonas reinhardtii* zu Fehlbildungen der NBBCs und den weiteren centrinhaltigen Strukturen führte. Jutta Schoppmeier zeigte durch Analysen des Phänotypes und durch mitotische Beobachtungen, dass die korrekte Aufteilung der Basalkörper in diesen Stämmen durch das Fehlen der NBBCs nicht beeinflusst wurde (siehe auch Koblenz et al., 2003). Dennoch konnte sowohl in dem Centrin-GFP-exprimierenden Stamm, wie auch in den RNAi-Stämmen ein Verlust der Assoziation zwischen Basalkörper und Spindelpol detektiert werden. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die NBBCs oder ähnliche centrinhaltige Strukturen für die Verankerung der Basalkörper an den Polen notwendig sind. Der Verlust dieser Assoziation resultiert jedoch nicht in Basalkörperfehlverteilungen. Diese Ergebnisse werden durch Beobachtung in weiteren Flagellaten gestützt. In

Polytomella agilis konnten keine NBBCs beobachtet werden und die Basalkörper sind nicht mit den Spindelpolen assoziiert (Schulze et al., 1987). Dennoch bleibt die Basalkörperzahl konstant. Auch in *Dunaliella bioculata* wird eine korrekte Aufteilung der Basalkörper während der Mitose nicht über ihre Fixierung an den Spindelpolen ermöglicht (Grunow und Lechtreck, 2001).

Ein alternativer Mechanismus, welcher die korrekte Segregation der Basalkörper während der Mitose erklären könnte, wurde bereits von Johnson und Porter (1968) postuliert. Ultrastrukturelle Untersuchungen mitotischer Zellen von *Chlamydomonas reinhardtii* zeigten eine mikrotubuläre Struktur zwischen den Basalkörpern, das sog. „Metaphaseband“. Diese „Metaphaseband“-Mikrotubuli sind identisch mit den beiden viersträngigen mikrotubulären Geißelwurzeln, die während der Interphase mit dem Basalapparat assoziiert sind. Zu Beginn der Mitose verlängern sich diese Mikrotubuli und überlappen antiparallel (Johnson und Porter, 1968; vgl. auch III.4 Ergebnisse). In den RNAi-Stämmen, die einen milden RNAi-Effekt ausprägten, konnte eine Assoziation der Basalkörper mit den Mikrotubuli des Metaphasebandes detektiert werden. Während der Mitose ist jedes Basalkörperpaar mit einem der beiden Mikrotubulibändern verbunden. Die Segregation der Basalkörper über eine Verlängerung der Mikrotubulibänder und über Motorproteine in dem Kontaktbereich der beiden Bänder scheint so möglich (Gaffal und el-Gammal, 1990; Ehler et al., 1995). Eventuell handelt es sich bei der Fixierung der Basalkörper an den Spindelpolen einerseits und der Verbindung zwischen Basalkörper und Metaphaseband andererseits, um zwei redundante Prozesse, die die korrekte Aufteilung dieser garantieren sollen.

Die Organisation der mikrotubulären Geißelwurzeln, aus denen sich das Metaphaseband während der Mitose bildet, weist in stark centrindefizienten Stämmen Fehler auf. Parallel hierzu könnten diese Strukturen auch während der Mitose ungeordnet bzw. fehlerhaft sein und so zu Segregationsdefekten der Basalkörper führen. In den wenigen I A10-Zellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, scheint dieses zuzutreffen. Demnach wäre Centrin nicht nur an der Organisation dieser Strukturen während der Mitose, sondern auch während der Interphase beteiligt.

Der Vergleich der RNAi-Stämme I A7 und I A10 zeigt, dass die beiden hier beschriebenen möglichen Kontrollmechanismen der Basalkörpersegregation, eine unterschiedlichen Centrinmenge benötigen, um korrekt ablaufen zu können. Die Ursache hierfür könnte darin liegen, dass die centrinhaltigen Strukturen, die zur

Fixierung der Basalkörper an den Spindelpolen nötig sind, Centrin als Bestandteil der Struktur selber benötigen. Bereits eine geringe Reduzierung der Centrinmenge in den Zellen könnte somit den Aufbau dieser Strukturen verhindern. In dem Metaphaseband bzw. in den mikrotubulären Geißelwurzeln wurde Centrin nicht als Bestandteil nachgewiesen. Eventuell ist Centrin demnach nur von Nöten, die Organisation dieser Strukturen zu bewerkstelligen. Centrin könnte die Ansatzstelle zwischen Basalkörper und Geißelwurzel bzw. Metaphaseband bilden oder Proteine regulieren, die diese Organisation ermöglichen.

Die korrekte Organisation der Mitosespindel in den RNAi-Zellen fand unabhängig von der Anzahl der Basalkörper statt. In Zellen, in denen keine Basalkörper mehr nachweisbar waren bzw. die vorhandenen Basalkörper nicht an den Polen lokalisiert waren, scheint die Spindelformation nicht beeinflusst zu sein. Die Pole der Spindel waren auch in diesem Fall fokussiert. Dies deutet darauf hin, dass die Basalkörper von *Chlamydomonas reinhardtii* - im Gegensatz zu den Centriolen der Vertebraten - nicht essentiell für die Formation der Spindel sind (z.B. Salisbury et al. 2002, vgl. auch I. Einleitung). Es scheint somit Unterschiede in der Funktion dieser beiden Strukturen zu geben.

Centrinfunktionen bezüglich der Basalkörperduplikation

In den RNAi-Stämmen mit stark verminderten Centringehalt konnte eine deutliche Verringerung der durchschnittlichen Basalkörperzahl pro Zelle beobachtet werden. Zusätzlich zu den Segregationsdefekten, die zu abweichenden Basalkörperzahlen in einzelnen Zellen, nicht aber zu einer Verringerung der durchschnittlichen Anzahl führen, müssen demnach Fehler während der Basalkörperreplikation stattfinden.

Die Bedeutung Centrins während der Prozesse der Basalkörper- bzw. Centriolen-duplikation wurde in unterschiedlichen Organismen nachgewiesen (z.B. Ivanovska und Rose, 2001; Klink und Wolniak, 2001; Salisbury et al., 2002; vgl. Einleitung), im Detail jedoch nicht geklärt. In Wildtypzellen von *Chlamydomonas reinhardtii* werden die neuen Basalkörper über eine strikt regulierte Duplikation der bereits Vorhandenen gebildet. Da neue Basalkörper ähnlich wie Centriolen immer in einem bestimmten Winkel proximal zu den alten Basalkörpern entstehen, könnte ihre Duplikation über diesen Mechanismus kontrolliert werden (Marshall und Rosenbaum, 2000). Ein mögliches Modell basiert auf der Annahme, dass die alten Basalkörper bestimmte Duplikationsstellen aufweisen, die als Matrize zum Aufbau der neuen

dienen (Marshall und Rosenbaum, 2000). Centrin könnte aber ebenso an der Regulation von z.B. Kinasen beteiligt sein, die die Duplikationsprozesse ermöglichen. In *Drosophila* etwa führt das Ausschalten von Cdk1 zu Abnormalitäten während der Centriolenduplikation (Vidwans et al., 2003). In Hefe wiederum konnte eine centrinregulierte Kinase identifiziert werden (Sullivan, 1998).

Da Centrin in Grünalgen kein Bestandteil der Basalkörper selber ist, können die Fehler während der Basalkörperduplikation nicht auf das Fehlen einer ihrer essentiellen Komponenten zurückzuführen sein. Auch in *S. cerevisiae* ist Centrin keine Komponente des Spindelpolkörpers (SPB) selbst. Das Vorkommen Centrins ist hier auf die "Half-bridge", einer mit den SPB assoziierten Struktur, beschränkt (Huang et al., 1988; Spang et al., 1993). Die "Half-bridge" ist während der Prozesse der SPB-Duplikation essentiell, da sie u.a. als Bildungsort der SPB-Vorläufer dient (Übersicht in Adams und Kilmartin, 2000). Eine ähnliche Funktion könnte Centrin während der Basalkörperduplikation in *Chlamydomonas reinhardtii* ausüben. So könnte Centrin eine Komponente der Ansatzstelle zur Bildung des neuen Basalkörpers am proximalen Ende des Bestehenden darstellen. In *Spermatozopsis similis*, einer weiteren begeißelten Grünalge, werden z.B. die neuen Basalkörper am Ende von centrinhaltigen Fasern gebildet (Lechtreck und Bornens, 2001). Centrin könnte des weiteren Kontrollfunktionen während des Prozesses der Basalkörperduplikation besitzen. In den stark centrindefizienten RNAi-Stämmen könnte demnach, im Gegensatz zu den Stämmen mit mildem RNAi-Effekt, die Konzentration Centrins nicht mehr ausreichen, um diese Funktionen auszuüben. Als Folge hiervon könnte die Duplikation der Basalkörper nicht mehr ablaufen.

Basalkörper bzw. Centriolen können - sofern diese Strukturen in den Zellen nicht vorliegen und somit nicht als Matrize dienen können - auch "de novo" gebildet werden. Beispiele für die "de novo"-Bildung von Basalkörpern wurden bereits in der Einleitung dieser Arbeit für *Naegleria guberi* und *Marsilia vestita* beschrieben (Fulton und Dingle, 1971; Klink und Wolniak, 2001). Untersuchungen in vfl2-Zellen zeigten, dass Zellen, die aufgrund von Segregationsdefekten keine Basalkörper mehr besaßen, diese innerhalb von wenigen Zellteilungen neu bilden konnten (Marshall et al., 2001). In Wildtypzellen von *Chlamydomonas reinhardtii* ist der Mechanismus der "de novo" Bildung auf meiotisch entstandene basalkörperfreie Zygoten beschränkt (Cavalier-Smith, 1974). Es wird angenommen, dass ein strikt regulierter Mechanismus die beiden Wege der Basalkörper- bzw. Centriolenbildung gegeneinander abgrenzt. Marshall et al. (2001) entwickelten ein Modell, welches die

Unterdrückung des “de novo“-Weges durch das Vorhandensein eines Basalkörpers reguliert. Als zusätzliche regulative Komponente wurde im Zusammenhang mit diesen Beobachtungen u.a. Centrin diskutiert (Marshall et al., 2001).

Auch in den Einzelzellanalysen der hier verwendeten RNAi-Stämme konnten einige Zellen ohne Basalkörper diese generieren. Diese Beobachtungen unterstützten die Theorie, dass in basalkörperfreien Zellen unter stark centrindefizienten Bedingungen, die Blockade des “de novo“-Weges zur Basalkörperbildung aufgehoben wird. Die “de novo“-Bildung der Basalkörper konnte in diesen Stämmen die verringerte Basalkörperzahl nicht komplementieren. Die Stämme besaßen weiterhin einen hohen Prozentsatz an basalkörperfreien Zellen (ca. 60-70%). Dies legt nahe, dass Centrin weitere Funktionen während der Basalkörperneubildung ausübt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Arbeiten in *Marsilia vestita* in denen beschrieben wird, dass ein Abbau der Centrin-mRNA die “de novo“-Bildung der Basalkörper inhibiert (Klink und Wolniak, 2001).

Die Rolle Centrins während der Basalkörperreifung in *Chlamydomonas reinhardtii*

In den Zellen der RNAi-Stämme I A10 und II N41, sowie in Stämmen mit einem vergleichbaren restlichen Centringehalt, konnten vermehrt unbegeißelte Basalkörper nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Basalkörper ergaben keine Fehler im Aufbau der Basalkörper selber, wie sie für andere Stämme mit Fehlern während der Geißelbildung beschrieben wurden (z.B. bld-2; uni-3; Dutcher, 2003). In allen untersuchten Stämmen konnten einige Geißeln nachgewiesen werden, die keine ersichtlichen Fehler in Struktur und Länge zeigten. Auch diese Beobachtung spricht dafür, dass die Basalkörper der RNAi-Stämme nicht aufgrund von Strukturdefekten an der Ausbildung einer Geißel gehindert wurden. Dennoch waren in stark centrindefizienten RNAi-Stämmen wie II N41 oft verkürzte Geißeln mit den Basalkörpern assoziiert. Die durchschnittliche Länge der Geißeln in II N41 betrug $9,4 \pm 2,85 \mu\text{m}$ (n= 67). Wildtypgeißeln wiesen eine durchschnittliche Länge von $12,1 \pm 0,98 \mu\text{m}$ (n= 44) auf. Da keine Verkürzung der Geißeln in vfl2 beschrieben wurde, scheint dieser Effekt nicht auf Fehler in der centrinhaltigen Übergangsregion zwischen Basalkörper und Axonema zurückzuführen sein.

Die Ausbildung einer Geißel wurde in *Chlamydomonas reinhardtii*, wie auch in anderen Organismen, als ein Zeichen für einen reifen älteren Basalkörper

beschrieben. Ein neu gebildeter Basalkörper durchläuft mindestens einen Zellzyklus, bevor er eine Geißel ausbildet (Gaffal und el-Gammal, 1990). Insofern lässt das Vorkommen von unbegeißelten Basalkörpern bzw. von Basalkörpern mit verkürzten Geißeln den Schluss zu, dass der Reifungsprozess dieser Basalkörper durch den Centrinmangel in den Zellen beeinflusst wird. Da in den Zellen des Stammes I A10 eine verringerte Centrinmenge in den Basalkörpern ohne Geißeln nachgewiesen werden konnte, scheint die Akkumulation von Centrin ein Schritt dieser Reifungsprozesse zu sein. Die Reifung von Basalkörpern beinhaltet darüber hinaus weitere Schritte. So findet eine Veränderung der Größe der Basalkörper und eine Assoziation dieser mit der Plasmamembran statt. Die Mikrotubuli der Triplets werden modifiziert und es entwickelt sich ein assoziiertes Fasersystem, sowie eine Übergangsregion zum Axonema (Johnson und Porter, 1968; Lechtreck und Geimer, 2000). In den RNAi-Stämmen konnten Fehler während einiger dieser beschriebenen Schritte nachgewiesen werden. So konnten z.B. in ultrastrukturellen Analysen der II N41-Zellen Basalkörper nachgewiesen werden, die nicht mit der Plasmamembran verbunden waren. Fehler in der Organisation des assoziierten Fasersystems konnten für Zellen der Stämme I A10 und II N41 gezeigt werden. Die sternförmige Übergangsregion zu dem Axonema der Geißel war in allen untersuchten RNAi-Stämmen defekt. Über Immunfluoreszenzpräparationen wurden Polyglutamylierungen und Acetylierungen der Mikrotubuli nachgewiesen. Polyglutamylierungen gelten als späte Modifikation der Basalkörper. Acetylierungen hingegen finden in einem frühen Stadium der Basalkörperreifung statt (Lechtreck und Geimer, 2000). Alle untersuchten centrinhaltigen Basalkörper wiesen sowohl Acetylierungen, wie auch Polyglutamylierungen der Mikrotubuli auf. Probasalkörper konnten über die Acetylierung der Mikrotubuli sowie über ihre Lage - seitlich zu den alten Basalkörpern zwischen den vier mikrotubulären Geißelwurzeln - charakterisiert werden. Diese Probasalkörper wiesen kein Centrin auf. Centrin scheint zu diesem Zeitpunkt der Basalkörperreifung, ähnlich wie in Wildtypzellen, nicht mit den Probasalkörpern assoziiert zu sein. Die abweichende Zahl an Probasalkörpern, die in RNAi-Zellen beobachtet wurde, ist wahrscheinlich auf die bereits beschriebenen Fehlverteilungen während der Mitose zurückzuführen.

Einige Basalkörper wiederum wiesen Polyglutamylierungen des Tubulins, jedoch keine Centrinakkumulation auf ($\leq 5\%$). Einige dieser Basalkörper waren mit einer Geißel assoziiert. Diese Beobachtung ist durch zwei mögliche Interpretationen zu erklären. Die Basalkörper könnten etwa im reifen Zustand, das während der

Reifungsprozesse akkumulierte Centrin, wieder verloren haben. Dies ließe den Schluss zu, dass Centrin zwar bedeutend während der Reifung, nicht aber notwendig zum Erhalt des reifen Zustandes wäre. Während der Spermiogenese von Mäusen hingegen führt ein Verlust des assoziierten Centrins zu der Degenerierung der Centriolen (Manandhar et al., 1999). Auch in *Naegleria* ist die Existenz der Basalkörpern während der Zelldifferenzierung an die Expression Centrins gekoppelt (Levy et al., 1998). In diesen Organismen ist die Assoziation Centrins demnach zum Erhalt der Basalkörper bzw. Centriolen essentiell. Eine alternative Interpretationsmöglichkeit der hier vorliegenden Daten basiert auf einem Reifungsprozess, der in einigen Fällen unabhängig von Centrin stattfinden kann. Centrin wäre demnach nicht unbedingt essentiell für die Reifung der Basalkörper. Centrinmangel jedoch könnte zu einer starken Verzögerungen dieser Prozesse führen.

Die Sensitivität der unterschiedlichen Centrinfunktionen bezüglich der verringerten Centrinmenge in den Zellen

Zwischen den einzelnen isolierten RNAi-Stämmen variierte die Menge des noch vorhandenen Centrins. Somit war es möglich, die unterschiedliche Sensitivität der Centrinfunktionen bezüglich eines variierenden Proteingehaltes zu untersuchen. In allen charakterisierten Stämmen - unabhängig von der Stärke des RNAi-Effektes - konnten keine centrinhaltigen Fasern mehr nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind möglicherweise dadurch zu erklären, dass Centrin in diesen Strukturen einen essentiellen Bestandteil darstellt. Eine geringe Verringerung der Centrinkonzentration führte hier bereits zu einem Mangel, einer zum Aufbau benötigten Komponente und verhinderte so die Bildung dieser Systeme. Diese Störungen bestätigen die Beobachtungen in vfl2. Gestützt werden diese Ergebnisse auch durch Analysen des Nit/RNAi-Stammes. In diesem Stamm konnte nach der Induktion des RNAi-Konstruktes zuerst ein Abbau des centrinhaltigen Kernfasersystems detektiert werden, welches von den NBBCs ausgehend den Kern umschließt. Eine weitere Verringerung der Centrinmenge resultierte in verkürzten NBBCs, die dann als weitere Folge des Centrinmangels nicht mehr ausgebildet wurden. Auch die distale Verbindungsfibrille zwischen den Basalkörpern konnte in diesen Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Erst nachdem diese Strukturen in den Zellen nicht mehr ausgebildet wurden, kam es zu Fehler während der Segregation bzw. Replikation der Basalkörper.

Der Stamm I A7 weist einen milden RNAi-Effekt auf und wurde durch einen restlichen Centringehalt von ca. 40% der Wildtypmenge charakterisiert. Im Gegensatz zu vfl2, war in dem Stamm I A7 kein Segregationsdefekt der Basalkörper nachzuweisen. Der Stamm bildete mehrheitlich Zellen mit zwei Basalkörpern aus. Diese Beobachtung spricht auch gegen Fehler während der Basalkörperreifung bzw. -replikation. Somit lässt dieser Stamm den Schluss zu, dass diese Prozesse nicht auf der Ausbildung von centrinhaltigen Fasern beruhen. Da die beiden Basalkörper in diesem Stamm immer als Paar vorlagen, kann auch die Bedeutung der distalen Verbindungsfibrille während der Ordnung der Basalkörper in Frage gestellt werden.

In dem Stamm IV F11 konnten erste Segregationsdefekte während der Mitose nachgewiesen werden, die in einer erhöhte Anzahl an Zellen mit abweichender Basalkörperzahl resultierten. Die durchschnittliche Basalkörperzahl der Zellen lag aber weiterhin bei 1,73. Dies deutet daraufhin, dass die Basalkörperreifung und -replikation weiterhin nur wenig beeinflusst wurde, während die mitotische Segregation der Basalkörper nicht mehr korrekt ablief.

Der Stamm I A10 wurde durch einen restlichen Centringehalt von ca. 28% der Wildtypmenge charakterisiert. Hier konnte zusätzlich zu den bereits beschriebenen Effekten eine Verminderung der durchschnittlichen Basalkörperzahl und vermehrt geißellose Basalkörper detektiert werden. Dies weist auf Fehler der Basalkörperreplikation und auf Verzögerungen im Reifungsprozess hin.

In den Stamm II N41, der ca. 5% der Wildtypmenge Centrins aufwies, wurden die Defekte des Stammes I A10 bestätigt. Fehler während der Basalkörperreifung und -Duplikation konnten hier vermehrt detektiert werden. Zusätzlich konnte in diesen Zellen eine erhöhte Anzahl an mehrkernigen Zellen nachgewiesen werden, was auf einen Fehler während der Zellteilung hinweist. Diese Beobachtung wurde durch das Vorkommen von Zellen mit mehreren Pyrenoiden bestätigt. In weiteren stark centrindefizienten Stämmen konnte darüber hinaus eine erhöhte Letalitätsquote der Zellen detektiert werden (VI E5 und VII G4).

Ein Centrinmangel in den Zellen führt demnach zuerst zu Fehlern in der Ausbildung der Fasern, in denen Centrin eine Hauptkomponente darstellt. Die weiteren Funktionen Centrins werden in der folgenden Reihenfolge blockiert: Geißelaufbau, Segregation, Reifung und Replikation der Basalkörper. Die Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die hier beschriebenen Abläufe.

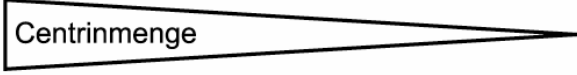
<div style="text-align: center;">  </div>					
	Nit/RNAi 3. Tag	Nit/RNAi 6. Tag	I A7	I A10	II N41
Kernfasersystem defekt	+++	+++	+++	+++	+++
NBBCs abwesend/defekt	+	+++	+++	+++	+++
dVF defekt	-	++	+++	+++	+++
Segregationsdefekte	-	-	+	++	+++
Fehler während der Geißelbildung	-	-	+	++	+++
Fehler während der Basalkörperreplikation	-	-	-	+	+++
Cytokinesedefekte	-	-	-	+	+++
Fehler während der Entgeißlung	-	-	-	-	+

Tabelle 7: Übersicht über die Empfindlichkeit der Centrinfunktionen gegenüber einer sinkenden Centrinmenge in unterschiedlichen RNAi-Stämmen

Nit/RNAi 3.Tag: Nit/RNAi-Stamm drei Tage nach der Induktion des RNAi-Mechanismus,

Nit/RNAi 6.Tag: Nit/RNAi-Stamm sechs Tage nach der Induktion des RNAi-Mechanismus

NBBC= "nucleus-basal body-connector", dVF= distale Verbindungsfibrille

Induktion des RNAi-Effektes durch eine Änderung der Kulturbedingungen

Der Vektor Nit/RNAi ermöglicht eine Induktion des RNAi-Effektes durch eine Änderung der Kulturbedingungen. Sieben Tage nach der Induktion bildeten 97,4% der Zellen des Nit/RNAi-Stammes einen centrindefizienten Phänotyp aus. In *Trypanosoma* ist der Abbau von ca. 85% der homologen mRNA durch eine Transfektion mit dsRNA bereits nach 1 Stunde nachzuweisen (Ngô et al., 1998).

Die Ursache für diesen verzögerten Effekt liegt wahrscheinlich nicht auf der Transkriptionsebene. Bereits 30 Minuten nach Induktion des Promotors konnte in der Arbeit von Quesada und Fernández (1994) eine Akkumulation des Transkriptes der Nitratreduktase nachgewiesen werden. Auch die Expression von GFP-Centrin unter der Kontrolle des Promotors zeigt bereits 3 1/2 Stunden nach der Induktion eine deutliche Akkumulation des Proteins (Dr. K.-F. Lechtreck; persönliche Mitteilung).

B) Untersuchungen zur Inaktivierung des RNAi-induzierenden Konstruktes

Das RNAi-induzierende Konstrukt wurde in allen verwendeten RNAi-Stämmen im Laufe einiger Monate inaktiviert. Als Folge dessen fand ein Abbau der homologen Centrin-mRNA nicht mehr statt und der Wildtypphänotyp der Zellen bildete sich wieder aus. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Versuche durchgeführt, die Einblicke in diese Vorgänge ermöglichen sollten.

Das inaktive Konstrukt konnte im Genom der RNAi-Stämme weiterhin über PCR nachgewiesen werden, so dass genetische Mechanismen, wie z.B. Deletionen, als Ursache ausgeschlossen werden konnten. Nachdem das Konstrukt inaktiviert wurde, konnte in keinem der Stämme eine erneute Aktivierung festgestellt werden. Die Inaktivierung blieb auch während des untersuchten Zeitraums von drei Monaten unter Bedingungen erhalten, unter denen keine Transkription des Konstruktes stattfand. Die Stabilität der Inaktivierung selbst unter repressiven Bedingungen legt nahe, dass das induzierende Konstrukt über eine Modifikation des im Genom integrierten Transgens ausgeschaltet wurde.

Die Integration des Konstruktes in das Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* erfolgte über nicht-homologe Rekombination. Alle in dieser Arbeit untersuchten RNAi-Stämme prägten zuerst einen RNAi-induzierten Phänotyp aus. Dies spricht dafür, dass die Konstrukte in unterschiedliche Bereiche des Euchromatins integrierten und spricht demnach gegen Positionseffekte, wie z.B. die Ausbreitung von repressiven Chromatinstrukturen an der Grenze zwischen Hetero- und Euchromatinbereichen. Weder das endogene Centringen noch Transgene, deren Expression von einer identischen Kopie des Promotors gesteuert wurden, waren durch diese Mechanismen beeinflusst. Dies spricht für einen sequenzspezifischen Vorgang der Inaktivierung.

Epigenetische "Silencing"-Effekte, die auf einer Erkennung von Sequenzhomologien der Nukleinsäuren basieren, sind in Pilzen, Pflanzen und Tieren sowohl auf RNA-, wie auch auf DNA-Niveau beschrieben worden (Faugeron, 2000; Fagard und Vaucheret, 2000; Birchler et al., 2000). Diese Prozesse, die zu einer Inhibierung der Transkription führen, sind unterschiedlicher Natur und werden über die Ausbildung von DNA-DNA- bzw. DNA-RNA-Interaktionen bewerkstelligt.

DNA-DNA-Interaktionen als mögliches Signal zur Induktion der Inaktivierung

Mehrfachintegrationen von Transgenen, sowie Transgene mit invertierten Sequenzwiederholungen, können transkriptional ausgeschaltet werden. In beiden Fällen dient die Ausbildung von DNA-DNA-Paarungen über die invertierten Bereiche bzw. zwischen zwei Kopien des Transgens als auslösendes Signal. Diese Paarungen können entweder Methylierungen und/oder die Ausbildung von repressiven Chromatinstrukturen in den entsprechenden Sequenzbereichen einleiten (Übersicht in Matzke und Matzke, 1995).

Das Konstrukt, das in dieser Arbeit verwendet wurde, weist solche invertierten Sequenzwiederholungen auf. Die Ausbildung einer DNA-Paarung zwischen den beiden Fragmenten des Centringens könnte somit ein auslösendes Signal für die Stilllegung sein. In dieser Arbeit konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen der Stärke des RNAi-Effektes und der Dauer der Aktivität des Konstruktes hergestellt werden. Stämme mit einem stark centrindefizienten Phänotyp wurden schneller inaktiviert als solche, die nur einen milden Effekt aufwiesen. Die Kultivierung des Nit/RNAi-Stammes unter repressiven Bedingungen verhinderte darüber hinaus ein Ausschalten des Konstruktes. Die Induktion von "Gensilencing" über DNA-DNA-Intermediate findet unabhängig von der Transkriptionsrate statt, da die Ausbildung dieser Struktur nur durch die Sequenzhomologie der DNA-Bereiche beeinflusst wird. Insofern lassen sich die beschriebenen Ergebnisse nicht über einen Inaktivierungsmechanismus erklären, der auf der Bildung von DNA-DNA-Interaktionen basiert. Darüber hinaus wird aufgrund von Studien in dem Pilz *Ascoibolus immersus* angenommen, dass komplementäre Bereiche eine Mindestlänge von ca. 300 bp aufweisen müssen, um die Ausbildung des DNA-DNA-Intermediates zu begünstigen (Rossignol und Faugeron, 1994). Innerhalb des Konstruktes hingegen existieren nur komplementäre Bereiche über ca. 100 bp und Southernblot-Analysen an exemplarischen Stämmen schließen Mehrfachintegrationen aus.

DNA-RNA-Interaktionen als mögliches Signal zur Induktion der Inaktivierung

In Pflanzenzellen ist doppelsträngige RNA (dsRNA) als Auslöser des "posttranscriptional gene silencing" (PTGS) nachgewiesen worden und leitet somit den Abbau der homologen mRNA ein (Zamore, 2000). Darüber hinaus kann diese

dsRNA auch zu Methylierungen der homologen DNA führen (Sijen und Kooter, 2001). Dies verdeutlicht, dass sowohl PTGS-, wie auch TGS-Prozesse durch das Vorhandensein des selben Signals ausgelöst werden können. In den RNAi-Stämmen dieser Arbeit könnte die dsRNA demnach zusätzlich zu den RNAi-Prozessen auch die Stilllegung des Konstruktes einleiten.

Ein mögliches Modell zur Erklärung des RNA-induzierten "Gensilencing" beinhaltet die Bildung eines DNA-RNA-Intermediates (Matzke und Matzke, 1995; Meyer und Saedler, 1996). Es wird angenommen, dass etwa die Ausbildung komplementärer Basenpaarungen zwischen RNA und DNA in Pflanzenzellen, die sequenzspezifische Methylierung dieser Bereiche durch Rekrutierung von Methyltransferasen ermöglicht. Pélissier und Wassenegger (2000) entwickelten die These, dass die Stabilität dieser Basenpaarungen durch die Sekundärstruktur und Sequenz der RNA bestimmt wird. Das Modell basiert auf der Annahme, dass einzelsträngige Bereiche der partiell dsRNA für die Ausbildung der RNA-DNA-Interaktion benötigt werden. Demnach scheint die Sequenz, die komplementär zu doppelsträngigen Bereichen der RNA ist, kein effektiver Angriffspunkt zur Ausbildung einer RNA-DNA-Paarung zu sein (Pélissier und Wassenegger, 2000).

Übertragen auf die hier vorliegenden Ergebnisse in *Chlamydomonas reinhardtii* könnte diese DNA-RNA-Interaktion die Angriffstelle für sequenzspezifisch vermittelte Stilllegung des Konstruktes sein. Ausgehend von den einzelsträngigen Bereichen am 5'- und 3'-Ende des Transkriptes könnte die Ausbildung der Basenpaarung eingeleitet werden. Eine Entwindung der dsRNA durch RNA-Helikasen würde die Ausbreitung des RNA-DNA-Hybrides in 5'- bzw. 3'- Richtung ermöglichen.

Mut6p wurde in *Chlamydomonas reinhardtii* als ein Mitglied der Familie der DEAH-Box-beinhaltenen RNA-Helikasen charakterisiert und übt wahrscheinlich Funktionen während des Abbaus von fehlerhafter RNA aus (Wu-Scharf et al., 2000). Ein "knock-out" des Gens *mut6* führt zu einer Akkumulation von fehlerhafter RNA und zusätzlich auch zu einer erhöhten Mobilität von Transposons (Wu-Scharf et al., 2000). Dies deutet eventuell auf weitere Funktionen von Mut6p während des "transcriptional gene silencings" hin, da homologieabhängige "Silencing"-Mechanismen auch für das Ausschalten von Transposons gezeigt werden konnten (Chaboissier et al., 1998; Jensen et al., 1999). Da es sich wahrscheinlich um ein kernlokalisiertes Protein handelt, könnte es die Entwindung der dsRNA ermöglichen.

Auch in anderen Organismen wurden Proteine charakterisiert, die sowohl in PTGS-, wie auch in TGS-Mechanismen involviert sind. In *D. melanogaster* z.B. ist Polycomb-

Protein-abhängiges TGS ebenfalls durch eine Mutation in PIWI beeinflusst, ein Protein, welches an RNAi-Prozessen beteiligt ist (Skipper, 2002). Ebenso kontrolliert das *argonaute4* Gen in *A. thaliana* sowohl die Akkumulation der sequenzspezifischen siRNA, wie auch DNA-Methylierungen (Zilberman et al., 2003).

Die Natur des auslösenden Signals der RNA-vermittelten DNA-Methylierung in Pflanzenzellen ist nicht vollständig geklärt. Es konnte bisher nicht gezeigt werden, ob die dsRNA zuerst über Dicer vermittelt in siRNA gespalten wird oder ob die gesamte Länge der dsRNA zur Induktion der DNA-Methylierungen benötigt wird (Aufsatz et al., 2002). Péliissier und Wassenegger (2000) konnten jedoch die minimale Länge der DNA-Zielsequenz auf 30 bp beschränken. Diese Länge reichte aus, um eine effektive - wenn auch verglichen mit längeren Fragmenten verringerte - Methylierung der Zielsequenz einzuleiten (Péliissier und Wassenegger, 2000).

Die Untersuchungen, die in dieser Arbeit an den inaktiven RNAi-Stämmen durchgeführt wurden, lassen Rückschlüsse über die Natur des induzierenden Signals in *Chlamydomonas reinhardtii* zu. Durch Transformation der inaktiven RNAi-Stämme mit dem Konstrukt unter der Kontrolle des identischen HSP70A/rbcS2-Fusionspromotors konnte gezeigt werden, dass eine erneute Induktion des RNAi-Effektes nicht möglich war. Die zweite Kopie des Konstruktes muss demnach unmittelbar nach der Integration in das Genom ausgeschaltet worden sein. Eine Transformation mit dem Konstrukt unter der Kontrolle des Nitratreduktase-Promotors hingegen führte zur erneuten Ausbildung des RNAi-Phänotyps in den Zellen. Auch die endogene Kopie des Nitratreduktase-Promotors, wie auch die Transkription eines anderen Transgens (SFA-GFP) unter der Kontrolle des HSP70A/rbcS2-Fusionspromotors, blieben von den Effekten des "Gensilencings" unbeeinflusst. Diese Differenzierung ist am besten über einen RNA-induzierten Mechanismus zu erklären, der ausschließlich Gene betrifft, die Sequenzhomologien zu, sowohl dem Promotor, wie auch zu dem Konstrukt, aufweisen. Ein mögliches Signal zur Induktion dieser TGS-Mechanismen könnte demnach in diesem Fall das Primärtranskript des Konstruktes sein. Diese dsRNA enthält, im Gegensatz zu der siRNA, die nach der Dicer vermittelten Prozessierung entsteht, sowohl Informationen über den Promotor, wie auch über das Konstrukt.

Die Ergebnisse unterstützen vorherige Beobachtungen in *Chlamydomonas reinhardtii*. So kann die Expression eines Transgens, welches unter die Kontrolle der 5'- und 3'- UTR Bereiche des RbcS2-Gens gesetzt wurde, zur Stilllegung dieses

Transgens führen. Die Expression des endogenen RbcS2-Gens bleibt jedoch in diesen Stämmen unbeeinflusst (Cerutti et al., 1997).

Für die Klonierungen des Konstruktes wurden nur Sequenzbereiche Centrins verwendet, die auf den Translationsstart folgten. Die 5'-UTR der hier exprimierten Konstrukte wies demnach ausschließlich Homologien zu den jeweils verwendeten Promotoren bzw. Vektoren auf. Basenpaarungen zwischen der 5'-UTR des Transkriptes und der im Genom integrierten Kopie des Konstruktes reichen demnach nicht aus, um die Differenzierung zwischen dem RNAi-induzierenden Konstrukt und den durch eine identische Kopie des Promotors kontrollierten Genen zu ermöglichen (GFP-SFA bzw. Nitratreduktase). Ein Rückschluss auf die minimale Länge der Basenpaarungen zwischen RNA und DNA ist hier folglich nicht möglich.

Weitere Versuche zur erneuten Induktion eines inaktiven RNAi-Stammes könnten dieses Modell überprüfen. So sollte, basierend auf den bisherigen Ergebnissen, ein RNAi-induzierendes Konstrukt gegen andere Sequenzbereiche des Centrings, auch unter der Kontrolle des HSP70/rbcS2-Promotors, die erneute Induktion des RNAi-Effektes ermöglichen. Die Expression von Sequenzbereichen, die ausschließlich Homologien zum Promotor aufweisen, sollten wiederum - analog zu den Ergebnissen in *Arabidopsis*, Tabak und Petunien (Mette et al., 2000; Sijen et al., 2001) - sowohl die Expression des RNAi-induzierende Konstruktes, wie auch die Expression von GFP-SFA inhibieren.

Veränderungen in der DNA aufgrund von TGS-Prozessen

In eukaryotischen Organismen, die die Fähigkeit zur Methylierung der DNA besitzen, führt TGS oft zu Methylierungen der entsprechenden Sequenzbereiche und zu der Ausbildung von repressiven Chromatinstrukturen (Zhang et al., 2002). In Pflanzenzellen konnte z.B. gezeigt werden, dass Methylierungen der symmetrischen CG und CNG Sequenzen, der zur dsRNA homologen Promotorbereiche, das Ausschalten des Genes bewirken (Aufsatz et al., 2002; Mette et al., 2000). Auch in Grünalgen konnten Methylierungen prinzipiell als Möglichkeit zur Regulation von Genaktivität nachgewiesen werden (Babinger et al., 2001; Umen und Goodenough, 2001). Dennoch konnten keine Methylierungen der symmetrischen CCGG-Sequenzen in den Promotor- bzw. Transgenbereichen des inaktiven RNAi-induzierenden Konstruktes nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse entsprechen vorherigen Untersuchungen in *Chlamydomonas reinhardtii*. Cerutti et al. (1997)

konnten keine Methylierungen der CCGG-Sequenzen in Transgenen, die mit nur einer Kopie im Genom integriert waren, detektieren. Im Gegensatz hierzu konnten Methylierungen dieser Sequenzen als Ursache zur Stilllegung von mehrfach integrierten Transgenen ermittelt werden (Cerutti et al., 1997). Da zuvor auch in Tabakpflanzen gezeigt werden konnte, dass eine Akkumulation des Transkriptes zu einer Inaktivierung des entsprechenden Gens führen kann, ist dieser Unterschied möglicherweise auf einen Dosiseffekt zurückzuführen (Vaucheret et al., 1998; Wassenegger et al., 1994). Gestützt auf diese Ergebnisse scheint in *Chlamdomonas reinhardtii* ein alternatives System zu existieren, dass die Stilllegung von Transgenen unabhängig von CCGG-Methylierungen bewirkt.

Ein alternatives Modell zur Stilllegung von Genen konnte durch die Entdeckung zweier TGS-defizienter Stämme (mut11 und mut9) in *Chlamydomonas reinhardtii* entwickelt werden. Das mut11-Gen kodiert für ein kernlokalisiertes Protein, welches sieben WD40-Wiederholungen aufweist und Ähnlichkeiten zu der carboxyterminalen Domäne von TUP1p besitzt (Zhang et al., 2002). TUP1p gehört zu der Familie der transkriptionaler Ko-Repressoren in Pilzen und weist Homologien zu weiteren regulatorischen Proteinen in *Arabidopsis* auf (Zhang et al., 2002). TUP1p interagiert direkt mit der Transkriptionsmaschinerie und vermittelt die Ausbildung von repressiven Chromatinstrukturen in *S. cerevisiae* über Nukleosom-Positionierung und/oder Rekrutierung von Histondeacetylasen (Bone und Roth, 2001; Smith und Johnson, 2000; Wu et al., 2000). Die Homologie zwischen Mut11p und TUP1p unterstützt eine direkte Rolle von Mut11p während der Prozesse der transkriptionalen Repression. In Analogie zu Tup1p könnte Mut11p demnach durch direkte Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie die Ausbildung repressiver Chromatinstrukturen über einen weiten Bereich des Genoms induzieren (Zhang et al., 2002). Alternativ dazu könnte Mut11p auch sequenzspezifisch in begrenzten Bereichen der Chromosomen repressive Formationen ausbilden. Hierfür spricht die Beobachtung, dass in Mut11p-defizienten Stämmen eine erhöhte Mobilität von Transposons detektiert wurden (Jeong et al., 2002). Transposons, die in limitierter Anzahl im Genom detektiert wurden, scheinen keine Methylierungen aufzuweisen und unterstützen somit die Annahme eines methylierungsunabhängigen Mechanismus zur sequenzspezifischen Stilllegung von Genen (Day et al., 1988; Ferris, 1989; Jeong et al., 2002).

Mut9p wurde als neue Serin/Threonin-Proteinkinase charakterisiert und spielt eventuell eine Rolle während der durch Phosphorylierung bewerkstelligten Organisation der Chromatinstruktur (Jeong et al., 2002). Ein “knock-out“ von Mut9p resultiert in einem Phänotyp, der u.a. auch eine erhöhte Mobilität von Transposons aufweist (Jeong et al., 2002). Ähnlich wie für Mut11p diskutiert, könnte demnach das Ausschalten des RNAi-induzierenden Konstruktes auch über eine Mut9p vermittelte Ausbildung repressiver Chromatinstrukturen erfolgen.

Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf des Ausschaltens des RNAi-induzierenden Konstruktes

In dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen der Stärke des RNAi-Effektes in den Zellen und der Dauer des Effektes gezeigt werden. Stämme, die einen starken centrindefizienten Phänotyp aufwiesen (z.B. V G4 und V G6) wurden zu einem früheren Zeitpunkt und innerhalb einer kürzeren Zeitspanne inaktiviert als solche, die nur einen milden Effekt ausprägten. Bei den Stämmen mit milden RNAi-Effekt (z.B. V H8 und V H9) konnte - über einen längeren Zeitraum hinweg - eine langsame Rückbildung des Wildtypphänotyps beobachtet werden. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine stetige Verringerung der Transkriptionsrate des Konstruktes. In den ursprünglich stark centrindefizienten Stämmen wurde die Transkriptionsrate demnach innerhalb eines kurzen Zeitraums stärker verringert, so dass bereits nach wenigen Wochen kein RNAi-Effekt in den Zellen mehr nachweisbar war. Die Regulationsmechanismen, die zum Ausschalten des Konstruktes geführt haben, lassen demnach intermediäre Zustände zu, in der die Transkription vermindert, aber noch nicht ausgeschaltet ist. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Transkriptionsrate des Konstruktes Einfluss auf die Initiation und auf die Effektivität des “Silencing“-Mechanismus hat.

Die Verbindung zwischen der Transkriptionsrate eines Transgens und der Initiation der Stilllegung des selben wurde bereits häufiger beschrieben. So werden etwa Trangene, deren Transkription von einem starken Promotor gesteuert wird, häufiger ausgeschaltet als schwach exprimierte (Que et al., 1997). Auch findet Kosuppression eher in homozygoten bzw. haploiden Organismen statt (Carvalho et al., 1992; Dorlhac de Borne et al., 1994; Hart et al., 1992). In den hier untersuchten Stämmen würde demnach die Transkriptionsrate des Konstruktes in allen Fällen ausreichen,

um das Ausschalten des Konstruktes einzuleiten. In den Stämmen mit ursprünglich schwachem RNAi-Effekt würde der Mechanismus jedoch verlangsamt ablaufen.

Im vorherigen Abschnitt wurde die Beteiligung von Mut11p bzw. Mut9p an diesen Regulationsmechanismen diskutiert. Mut11p könnte entweder durch direkte Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie oder durch die Ausbildung von repressiven Chromatinstrukturen diese Regulation der Transkription ermöglichen (Zhang et al., 2002). Mut9p wiederum könnte die Ausbildung von repressiven Chromatinstrukturen über Phosphorylierungen einleiten (Jeong et al., 2002). In beiden Fällen ist es vorstellbar, dass das Ausschalten des Konstruktes über intermediäre Zustände ablaufen könnte. Dennoch resultierte die Einleitung dieser Regulationsmechanismen in allen hier untersuchten Fällen letztendlich in der Stilllegung des Konstruktes.

Über die Veränderungen im Genom, die durch die diskutierten TGS-Mechanismen eingeleitet wurden, konnte in dieser Arbeit nur spekuliert werden. Weitere Untersuchungen an den inaktiven RNAi-Stämmen könnten helfen, diese Vorgänge zu verstehen. Kreuzungen zwischen den mut-Stämmen und den inaktiven RNAi-Stämmen sollten z.B. Tochterzellen zu Folge haben, in denen das Konstrukt reaktiviert wurde. Durch diese Ansätze könnte ermittelt werden, inwieweit Mut11p bzw. Mut9p an den hier vorliegenden TGS-Mechanismen beteiligt ist. Die Transformation der mut-Stämme mit dem RNAi-induzierenden Konstrukt wiederum sollte zu Stämmen führen, in denen das Konstrukt stabil exprimiert wird.

Die Interaktion zwischen Mut11p bzw. Mut11p beinhaltenden Proteinaggregaten und den inaktiven Konstrukten könnte z.B. durch "Electrophoretic Mobility Shift Assays" (EMSA) analysiert werden. Ebenso könnte die Bedeutung von Mut9p über diese Ansätze untersucht werden. Eine eventuelle Interaktion zwischen Mut11p und den Proteinen der Transkriptionmachinerie wiederum könnte durch Kopräzipitation oder "Blot-overlays" gezeigt werden.

V. Zusammenfassung

Centrin ist ein ubiquitäres Protein und konnte in den Centrosomen bzw. centrosomverwandten Strukturen vieler eukaryotischer Zellen nachgewiesen werden. Untersuchungen in verschiedenen Organismen sprechen für eine bedeutende Rolle Centrins während der Duplikation und der “de novo“-Bildung von Centriolen bzw. Basalkörpern. In *Chlamydomonas reinhardtii* ist Centrin darüber hinaus ein Bestandteil fibrillärer Strukturen und ermöglicht somit wahrscheinlich u.a. die Motilität der Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Funktionen Centrins über einen centrindefizienten Phänotyp in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* untersucht. Die Verminderung der Centrinexpression wurde über einen Mechanismus ermöglicht, der den sequenzspezifischen Abbau der Centrin-mRNA einleitete (“RNAi interference“; RNAi). Stämme, die unterschiedliche Mengen an restlichem Centrin exprimierten, ließen Schlüsse über die Empfindlichkeit der unterschiedlichen Centrinfunktionen gegenüber einer sinkenden Proteinkonzentration zu. Die RNAi-Stämme dieser Arbeit bildeten einen Phänotyp aus, der durch eine variable Anzahl an Geißeln bzw. Basalkörpern (BK) und ein Fehlen der centrinhaltigen Strukturen gekennzeichnet war. In stark centrindefizienten RNAi-Stämmen fand eine Verminderung der durchschnittlichen Geißel- bzw. Basalkörperzahl der Zellen statt. Zudem konnten oft unbegeißelte Basalkörper und basalkörperfreie Zellen detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten auf Fehler während der Basalkörperreplikation und –reifung hin. Zusätzlich konnten Segregationsdefekte während der Mitose detektiert werden. Eine erhöhte Anzahl an Zellen war mehrkernig und eine verminderte Lebensfähigkeit der Zellen dieser Stämme konnte nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Anzahl bzw. das Fehlen von Basalkörpern störte zudem die Organisation des mikrotubulären Cytoskeletts und der Basalapparat-assoziierten Fasern. In RNAi-Stämmen, die einen hohen restlichen Gehalt an Centrin aufwiesen, waren die Prozesse der Basalkörperreifung und –replikation sowie die Segregation dieser nur geringfügig beeinflusst. Da auch in diesen Stämmen keine centrinhaltigen Fasern mehr ausgebildet wurden, scheinen die Prozesse unabhängig von diesen Fasern abzulaufen.

Im Laufe der Zeit konnte eine Inaktivierung des RNAi-induzierenden Konstrukt in allen Stämmen nachgewiesen werden. Stämme, die einen starken centrindefizienten Phänotyp aufwiesen wurden zu einem früheren Zeitpunkt und innerhalb einer

kürzeren Zeitspanne inaktiviert als solche, die nur einen milden Effekt ausprägten. Methylierungen der CCGG-Sequenzen in Promotor- bzw. Konstruktbereichen konnten als Ursache zur Stilllegung ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen, die an diesen inaktiven RNAi-Stämmen durchgeführt wurden, sprechen für einen sequenzspezifischen Mechanismus, der über die Ausbildung von intermediären Zuständen die Inaktivierung des Konstruktes einleitete.

Summary

Centrin, a ubiquitous calcium-binding protein, is a constituent of centrosomes in many eukaryotic cells. In green algae, and other flagellates centrin is also component of fibres associated with the basal apparatus and is predicted to play a role in motility processes. In this work, nuclear transformation with a construct inducing RNAi was used to study the effect of centrin deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. Transformants contained different amounts of residual centrin (down to 5% of wildtype) and displayed a variable flagellar number phenotype. Residual centrin was concentrated at the basal bodies (bb) whereas centrin containing fibers were absent or defective. A strong centrin knock-down gave rise to strains with mostly nonflagellated cells and high numbers of cells without bb. These observations indicate a role for centrin during bb replication and maturation. In addition the mitotic segregation of the bb was disturbed in cells displaying a low amount of residual centrin. Additional basal bodies served as extra MTOCs and organized a polycentric microtubular cytoskeleton. In cells without bb the microtubular cytoskeleton was unordered and the organization of the flagella root system was defective. Furthermore, the number of multinucleated cells was increased indicating that aberrant numbers of bb interfered with cytokinesis.

The repression of the centrin gene was not stable and all strains lost their mutant phenotype after a period of time. The loss of the mutant phenotype was negatively correlated to the intensity of the effect: strong initial expression resulted in a rapid loss of RNAi effect whereas weaker repression was longer lasting. The inactivation of RNAi was not caused by CCGG methylation of the transgene. Further experiments with the inactive RNAi strains indicate, that the transgene was silenced by a sequence-specific mechanism, which allowed the repression of transcription over an intermediate status.

VI. Literaturverzeichnis

- Adams, I.R. und Kilmartin, J.V. (2000) Spindle pole body duplication: a model for centrosome duplication? *Trends Cell Biol.* 10:329-35.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. und Mukherjee, S.K. (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:657-85.
- Ambros, V. (2003) MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 113:673-6.
- Anderson, R.A., Barr, D.J.S., Lynn, D.H., Melkonian, M., Moestrup, O und Sleight, M.A. (1991) Terminology and nomenclature of the cytoskeletal elements associated with the flagella/ciliary apparatus in protists. *Protoplasma* 164:1-8
- Ares, M. Jr. und Howell, S.H. (1982) Cell cycle stage-specific accumulation of mRNAs encoding tubulin and other polypeptides in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:5577-81.
- Aufsatz, W., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, A.J. und Matzke, M. (2002) RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 Suppl 4:16499-506. Epub 2002 Aug 08.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1995) Short protocols in molecular biology. Third Edition. Wiley & Sons, Inc.
- Babinger, P., Kobl, I., Mages, W. und Schmitt, R. (2001) A link between DNA methylation and epigenetic silencing in transgenic *Volvox carteri*. *Nucleic Acids Res.* 29(6):1261-71.
- Biggins, S. und Rose, M.D. (1994) Direct interaction between yeast spindle pole body components: Kar1p is required for Cdc31p localization to the spindle pole body. *J. Cell Biol.* 125(4):843-52.
- Birchler, J.A, Bhadra, M.P. und Bhadra, U.(2000) Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10:211-6.
- Bobinnec, Y., Khodjakov, A., Mir, L.M., Rieder, C.L., Edde, B. und Bornens, M. (1998) Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J. Cell. Biol.* 143:1575-89.
- Bone, J.R. and Roth, S.Y. (2001) Corepressor proteins and control of transcription in yeast. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 254:59-78.
- Brokaw, C.J. und Luck, D.J. (1985) Bending patterns of *Chlamydomonas* flagella: III. A radial spoke head deficient mutant and a central pair deficient mutant. *Cell Motil.* 5:195-208.

- de Carvalho, F., Gheysen, G., Kushnir, S., Van Montagu, M., Inze, D. und Castresana, C. (1992) Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J.* 11:2595-602.
- Cavalier-Smith, T. (1974) Basal body and flagellar development during the vegetative cell cycle and the sexual cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Sci.* 16:529-56.
- Cerutti, H. (2003) RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet.* 19:39-46.
- Cerutti, H., Johnson, A.M., Gillham, N.W. und Boynton, J.E. (1997) Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 9:925-45.
- Chaboissier, M.C., Bucheton, A. und Finnegan, D.J. (1998) Copy number control of a transposable element, the I factor, a LINE-like element in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:11781-5.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1):156-9.
- Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U. und Macino, G. (1996) Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J.* 15:3153-63.
- Coling, D.E. und Salisbury, J.L. (1992) Characterization of the calcium-binding contractile protein centrin from *Tetraselmis striata* (Pleurostrophyceae). *J. Protozool.* 39(3):385-91.
- Conde, J. und Fink, G.R. (1976) A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73:3651-5.
- Coss, R.A. (1974) Mitosis in *Chlamydomonas reinhardtii* basal bodies and the mitotic apparatus. *J. Cell Biol.* 63:325-9.
- Day, A., Schirmer-Rahire, M., Kuchka, M.R., Mayfield, S.P. und Rochaix, J.D. (1988) A transposon with an unusual arrangement of long terminal repeats in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J.* 7:1917-27.
- Dorlhac de Borne, F., Vincentz, M., Chupeau, Y. und Vaucheret, H. (1994) Co-suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 243:613-21.
- Dutcher, S.K. (2003) Elucidation of basal body and centriole functions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic* 4:443-51.
- Ehler, L.L., Holmes, J.A. und Dutcher, S.K. (1996) Loss of spatial control of the mitotic spindle apparatus in a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain lacking

- basal bodies. *Genetics*. 141:945-60. Erratum in: *Genetics* 1996 Feb;142:following 650.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K. und Tuschl, T. (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 26:199-213.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber K., Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-8.
- Fagard, M. und Vaucheret, H. (2000) Systemic silencing signal(s). *Plant Mol. Biol.* 43:285-93.
- Faugeron, G. (2000) Diversity of homology-dependent gene silencing strategies in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:144-8
- Ferris, P.J. (1989) Characterization of a *Chlamydomonas* transposon, Gulliver, resembling those in higher plants. *Genetics*. 122(2):363-77.
- Fire, A., Xu S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. und Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *C.elegans*. *Nature* 391:806-811
- Fuhrmann, M., Stahlberg, A., Govorunova, E., Rank, S. und Hegemann, P. (2001) The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *J. Cell Sci.* 114:3857-63.
- Fuhrmann, M., Oertel, W. und Hegemann, P. (1999) A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 19:353-61.
- Fulton, C. und Dingle, A.D. (1971) Basal bodies, but not centrioles, in *Naegleria*. *J. Cell. Biol.* 51(3):826-36.
- Gaffal, K.P. und el-Gammal, S. (1990) Elucidation of the enigma of the „metaphase band“ of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma* 156:139-148
- Gavet, O., Alvarez, C., Gaspar, P. und Bornens, M. (2003) Centrin4p, a novel mammalian centrin specifically expressed in ciliated cells. *Mol. Biol. Cell.* 14:1818-34.
- Geimer, S., Teltenkötter, A., Plessmann, U., Weber, K. und Lehtreck, K.-F. (1997) Purification and characterization of basal apparatuses from a flagellate green alga. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 37:72-85.
- Gorman, D.S. und Levine, R.P. (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54(6):1665-9.
- Grunow, A. und Lehtreck, K.-F. (2001) Mitosis in *Dunaliella bioculata* (Chlorophyta): Centrin but not basal bodies are at the spindle poles. *J. Phycol.* 37:1030-1043

- Gumpel, N.J., Rochaix, J.D. und Purton, S. (1994) Studies on homologous recombination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 26:438-42.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature* 418:244-51.
- Hart, C.M., Fischer, B., Neuhaus, J.M. und Meins, F. Jr. (1992) Regulated inactivation of homologous gene expression in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants containing a defense-related tobacco chitinase gene. *Mol. Gen. Genet.* 235:179-88.
- Hart, P.E., Glantz, J.N., Orth, J.D., Poynter, G.M. und Salisbury, J.L. (1999) Testis-specific murine centrin, Cetn1: genomic characterization and evidence for retroposition of a gene encoding a centrosome protein. *Genomics* 60:111-20.
- Hayashi, M., Yagi, T., Yoshimura, K. und Kamiya, R. (1998) Real-time observation of Ca^{2+} -induced basal body reorientation in *Chlamydomonas*. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 41:49-56.
- Huang, B., Watterson, D.M., Lee, V.D. und Schibler, M.J. (1988) Purification and characterization of a basal body-associated Ca^{2+} -binding protein. *J. Cell Biol.* 101:121-31.
- Hutvágner, G. und Zamore, P.D. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297:2056-60.
- Ivanovska, I. und Rose, M.D. (2001) Fine structure analysis of the yeast centrin, cdc31p, identifies residues specific for cell morphology and spindle pole body duplication. *Genetics* 157:503-518.
- Jacobsen, S.E., Running, M.P. und Meyerowitz, E.M. (1999) Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126:5231-43.
- Jaspersen, S.L., Giddings, T.H. Jr. und Winey, M. (2002) Mps3p is a novel component of the yeast spindle pole body that interacts with the yeast centrin homologue Cdc31p. *J. Cell Biol.* 159:945-56.
- Jensen, S., Gassama, M.P. und Heidmann T. (1999) Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat Genet.* 21:209-12.
- Jeong, B.R., Wu-Scharf, D., Zhang, C. und Cerutti, H. (2002) Suppressors of transcriptional transgenic silencing in *Chlamydomonas* are sensitive to DNA-damaging agents and reactivate transposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 22;99(2):1076-81.
- Johnson, U.G. und Porter, K.R. (1968) Fine structure of cell division in *Chlamydomonas reinhardtii*. Basal bodies and microtubules. *J. Cell Biol.* 38:403-25.
- Kalt, A. und Schliwa, M. (1993) Molecular components of the centrosome. *Trends Cell. Biol.* 3:118-28.

- Kawasaki, H. und Kretsinger, R.H. (1995) Calcium-binding proteins 1: EF-hands. *Protein Profile* 2:297-490.
- Kellogg, D.R., Moritz, M. und Alberts, B.M. (1994) The centrosome and cellular organization. *Annu. Rev. Biochem.* 63:639-74.
- Kindle, K.L. (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:1228-32
- Kilmartin, J.V. (2003) Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* 162:1211-21.
- Klink, V.P. und Wolniak, S.M. (2001) Centrin is necessary for the formation of the motile apparatus in spermatids of *Marsilea*. *Mol. Biol. Cell.* 12:761-76.
- Koblenz, B., Schoppmeier, J., Grunow, A. und Lechtreck, K.-F. (2003) Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J. Cell Sci.* 116:2635-46.
- Kochanski, R.S. und Borisy, G.G. (1990) Mode of centriole duplication and distribution. *J. Cell. Biol.* 110:1599-605.
- Kretsinger, R.H. (1987) Calcium coordination and the calmodulin fold: divergent versus convergent evolution. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 52:499-510.
- Kuchka, M.R. und Jarvik, J.W. (1982) Analysis of flagellar size control using a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* with a variable number of flagella. *J. Cell Biol.* 92:170-5.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15:227:680-5.
- Lambert, A.M. (1993) Microtubule-organizing centers in higher plants. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5:116-22.
- Laoukili, J., Perret, E., Middendorp, S., Houcine, O., Guennou, C., Marano, F., Bornens, M. und Tournier, F. (2000) Differential expression and cellular distribution of centrin isoforms during human ciliated cell differentiation in vitro. *J. Cell Sci.* 113:1355-64.
- Lechtreck, K.-F., Rostmann, J. und Grunow, A. (2002) Analysis of *Chlamydomonas* SF-assemblin by GFP tagging and expression of antisense constructs. *J Cell Sci.* 115:1511-22.
- Lechtreck, K.-F. und Bornens, M. (2001) Basal body replication in green algae- when and where does it start? *Eur. J. Cell Biol.* 80:631-41.
- Lechtreck, K.-F. und Geimer, S. (2000) Distribution of polyglutamylated tubulin in the flagellar apparatus of green flagellates. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47:219-35.
- Lechtreck, K.-F. und Melkonian, M. (1991) An update on fibrous flagella roots in green algae. *Protoplasma* 164:38-44

- LeDizet, M. und Piperno, G. (1986) Cytoplasmic microtubules containing acetylated alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*: spatial arrangement and properties. *J. Cell Biol.* 103:13-22.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry.* 16:4743-51.
- Levy, Y.Y., Lai, E.Y., Remillard, S.P. und Fulton, C. (1998) Centrin is synthesized and assembled into basal bodies during *Naegleria* differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton.* 40:249-60.
- Lipardi, C., Wei, Q. und Paterson, B.M. (2001) RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107:297-307.
- Loppes, R., Radoux, M., Ohresser, M.C. und Matagne, R.F. (1999) Transcriptional regulation of the Nia1 gene encoding nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nia1 promoter. *Plant Mol. Biol.* 41:701-11.
- Ma, P., Winderickx, J., Nauwelaers, D., Dumortier, F., De Doncker, A., Thevelein, J.M., Van Dijck, P. (1999) Deletion of SFI1, a novel suppressor of partial Ras-cAMP pathway deficiency in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, causes G(2) arrest. *Yeast* 15:1097-109.
- Manandhar, G., Simerly, C., Salisbury, J.L. und Schatten, G. (1999) Centriole and centrin degeneration during mouse spermiogenesis. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 43:137-44.
- Marshall, W.F., Vucica, Y. und Rosenbaum, J.L. (2001) Kinetics and regulation of de novo centriole assembly. Implications for the mechanism of centriole duplication. *Curr. Biol.* 11:308-17.
- Marshall, W.F. und Rosenbaum, J.L. (2000) How centrioles work: lessons from green yeast. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12:119-25.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. und Tuschl, T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110:563-74.
- Martinsdale, V.E. und Salisbury, J.L. (1990) Phosphorylation of algal centrin is rapidly responsive to change in the external milieu. *J. Cell Science* 96:395-402
- Matzke, M.A., Matzke, A.J., Pruss, G.J. und Vance, V.B. (2001) RNA-based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:221-7.
- Matzke, M.A. und Matzke, A. (1995) How and Why Do Plants Inactivate Homologous (Trans)genes? *Plant Physiol.* 107:679-685

- Melkonian, M., Beech, P.L., Katsaros, C. und Schulze, D. (1992) Centrin-mediated cell motility in algae. In: Melkonian M. (Hrsg.) *Algal cell motility*. S.179-221. Chapman and Hall. New York
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. und Matzke, A.J.(2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19(19):5194-201.
- Meyer, P. und Saedler, H. (1996) Homology-dependent gene silencing in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:23-48.
- Middendorp, S., Paoletti, A., Schiebel, E. und Bornens, M. (1997) Identification of a new mammalian centrin gene, more closely related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC31 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9141-6.
- Mitchison, T. und Kirschner, M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237-42.
- Mochizuki, K., Fine, N.A., Fujisawa, T. und Gorovsky, M.A. (2002) Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell* 110:689-99.
- Napoli, C., Lemieux, C. und Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* 2:279-289.
- Neuhoff, V., Philipp, K., Zimmer, H.G. und Mesecke, S. (1979) A simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 360:1657-70.
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K. und Ullu, E. (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:14687-92.
- Nykänen, A, Haley, B, Zamore, P.D. (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107:309-21.
- Oakley, C.E. und Oakley, B.R. (1989) Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 338:662-4.
- Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrand, M., Salisbury, J.L. und Bornens, M. (1996) Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J. Cell. Sci.* 109:3089-102.
- Pasquinelli, A.E. und Ruvkun, G. (2002) Control of developmental timing by microRNAs and their targets. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18:495-513.
- Pélissier, T. und Wassenegger, M. (2000) A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA* 6:55-65.

- Pickett-Heaps, J.D. (1970) Mitosis and autospore formation in the green Alga *Kirchneriella lunaris*. *Protoplasma* 70:325-347
- Piperno, G. und Luck, D.J. (1977) Microtubular proteins of *Chlamydomonas reinhardtii*. An immunochemical study based on the use of an antibody specific for the beta-tubulin subunit. *J. Biol. Chem.* 252:383-91.
- Que, Q., Wang, H.Y., English, J.J. und Jorgensen, R.A. (1997) The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell*. 9:1357-1368.
- Quesada, A. und Fernandez, E. (1994) Expression of nitrate assimilation related genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 24:185-94.
- Reed, R. und Hurt, E. (2002) A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 10:523-31.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. und Bartel, D.P. (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* 16:1616-26.
- Rossignol, J.L. und Faugeron, G. (1994) Gene inactivation triggered by recognition between DNA repeats. *Experientia*. 50(3):307-17
- Ruiz-Binder, N.E., Geimer, S. und Melkonian, M. (2002) In vivo localization of centrin in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 52:43-55.
- Salisbury, J.L. (2004) Centrosomes: Sfi1p and centrin unravel a structural riddle. *Curr. Biol.* 14:R27-9.
- Salisbury, J.L., Suino, K.M., Busby, R. und Springett, M. (2002) Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* 12:1287-92.
- Salisbury, J.L. (1998) Roots. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45:28-32.
- Salisbury, J.L. (1995) Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:39-45.
- Salisbury, J.L., Baron, A.T. und Sanders, M.A. (1988) The centrin-based cytoskeleton of *Chlamydomonas reinhardtii*: distribution in interphase and mitotic cells. *J. Cell Biol.* 107:635-41.
- Salisbury, J.L., Baron, A., Surek, B. und Melkonian, M. (1984) Striated flagellar roots: isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle. *J. Cell Biol.* 99:962-70.
- Sanders, M.A. und Salisbury, J.L. (1994) Centrin plays an essential role in microtubule severing during flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 124:795-805.
- Schiebel, E. und Bornens, M. (1995) In search of a function for centrins. *Trends Cell Biol.* 5:197-201.

- Schroda, M., Blocker, D. und Beck, C-F. (2000) The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 21:121-31.
- Schulze, D., Robenek, H., McFadden, G.I. und Melkonian, M. (1987) Immunolocalization of a Ca^{2+} -modulated contractile protein in the flagellar apparatus of green algae: the nucleus basal body connector. *Eur. J. Cell Biol.* 45:51-61
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. und Fire, A. (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107:465-76.
- Sijen, T. und Kooter, J.M. (2001) Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *Bioessays* 22:520-31.
- Silflow, C.D., Rosenbaum, J.L. (1981) Multiple alpha- and beta-tubulin genes in *Chlamydomonas* and regulation of tubulin mRNA levels after deflagellation. *Cell* 24:81-8.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A. (1998) Strasburger Lehrbuch der Botanik. 34. Auflage. Gustav Fischer Verlag
- Skipper, M. (2002) RNA interference: Interfering with infection. *Nat. Rev. Genet.* 3: 572-573
- Smith, E.F. und Lefebvre, P.A. (1997) The role of central apparatus components in flagellar motility and microtubule assembly. *Cell Motil Cytoskeleton.* 38:1-8.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. und Waterhouse, P.M. (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407(6802):319-20.
- Smith, R.L. und Johnson, A.D. (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 25:325-30.
- Sodeinde, O.A. und Kindle, K.L. (1993) Homologous recombination in the nuclear genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90(19):9199-203.
- Spang, A., Courtney, I., Fackler, U., Matzner, M. und Schiebel, E. (1993) The calcium-binding protein cell division cycle 31 of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the half bridge of the spindle pole body. *J. Cell Biol.* 123:405-16.
- Stevens, D.R., Rochaix, J.D. und Purton, S. (1996) The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol. Gen. Genet.* 251:23-30.
- Stryer, L. (1996) Biochemie. 4. Auflage, Spektrum Akad. Verlag Oxford
- Sullivan, D.S., Biggins, S. und Rose, M.D. (1998) The yeast centrin, cdc31p, and the interacting protein kinase, Kic1p, are required for cell integrity. *J. Cell. Biol.* 14:751-65.

- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. und Mello, C.C. (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99:123-32.
- Taillon, B.E. und Jarvik, J.W. (1995) Release of the cytoskeleton and flagellar apparatus from *Chlamydomonas*. *Methods Cell Biol.* 47:307-13.
- Taillon, B.E., Adler, S.A., Suhan, J.P. und Jarvik, J.W. (1992) Mutational analysis of centrion: an EF-hand protein associated with three distinct contractile fibers in the basal body apparatus of *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* 119:1613-24
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4.
- Umen, J.G. und Goodenough, U.W. (2001) Chloroplast DNA methylation and inheritance in *Chlamydomonas*. *Genes Dev.* 15(19):2585-97.
- Vallen, E.A., Hiller, M.A., Scherson, T.Y. und Rose, M.D. (1992) Separate domains of KAR1 mediate distinct functions in mitosis and nuclear fusion. *J. Cell Biol.* 117:1277-87.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Mourrain, P., Palauqui, J.C. und Vernhettes, S. (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* 16:651-9
- Vaucheret, H., Vincentz, M., Kronenberger, J., Caboche, M. und Rouze, P. (1989) Molecular cloning and characterisation of the two homologous genes coding for nitrate reductase in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 216(1):10-5.
- Vaughn, K.C. und Harper, J.D. (1998) Microtubule-organizing centers and nucleating sites in land plants. *Int. Rev. Cytol.* 181:75-149.
- Vidwans, S.J., Wong, M.L. und O'Farrell, P.H. (2003) Anomalous centriole configurations are detected in *Drosophila* wing disc cells upon Cdk1 inactivation. *J. Cell Sci.* 116:137-43.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. und Sanger H.L. (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell.* 76(3):567-76.
- Weber, C., Lee, V.D., Chazin, W.J. und Huang, B. (1994) High level expression in *Escherichia coli* and characterization of the EF-hand calcium-binding protein caltractin. *J. Biol. Chem.* 269:15795-802.
- Wiech, H., Geier, B.M., Paschke, T., Spang, A., Grein, K., Steinkötter, J., Melkonian, M. und Schiebel, E. (1996) Characterization of green alga, yeast, and human centrin. Specific subdomain features determine functional diversity. *J. Biol. Chem.* 271:22453-61.
- Wiese, C. und Zheng, Y. (1999) A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat. Cell Biol.* 2:358-64.

- Wolff, A., de Nechaud, B., Chillet, D., Mazarguil, H., Desbruyeres, E., Audebert, S., Edde, B., Gros, F. und Denoulet, P. (1992) Distribution of glutamylated alpha and beta-tubulin in mouse tissues using a specific monoclonal antibody, GT335. *Eur. J. Cell Biol.* 59:425-32.
- Wright, R.L., Adler, S.A., Spanier, J.G. und Jarvik, J.W. (1989) Nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas*: evidence for a role in basal body segregation and against essential roles in mitosis or in determining cell polarity. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 14:516-26.
- Wright, R.L., Salisbury, J.L. und Jarvik, J.W. (1985) A nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas reinhardtii* that may function in basal body localization or segregation. *J. Cell Biol.* 101:1903-12.
- Wu, J., Suka, N., Carlson, M. und Grunstein, M. (2001) TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Mol. Cell.* 7:117-26.
- Wu-Scharf, D., Jeong, B., Zhang, C. und Cerutti, H. (2000) Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* 290:1159-62.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. und Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33.
- Zhang, C., Wu-Scharf, D., Jeong, B.R. und Cerutti, H. (2002) A WD40-repeat containing protein, similar to a fungal co-repressor, is required for transcriptional gene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 31(1):25-36.
- Zhang, D. und Lefebvre, P.A. (1997) FAR1, a negative regulatory locus required for the repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics.* 146:121-33.
- Zilberman, D., Cao, X. und Jacobsen, S.E. (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299(5607):716-9. Epub 2003 Jan 09.

VII. Anhang

Verwendete Primer:

Cenfor: 5'- GCG TCT AGA ATG AGC TAC AAG GCA AAG ACC -3'

CensenseR1: 5'- CGC CAA GCT TCT GCA TGT ATA GAA GTC AGG C -3'

CenantiF1: 5'- GCG GAA TCC ATG AGC TAC AAG GCA AAG ACC -3'

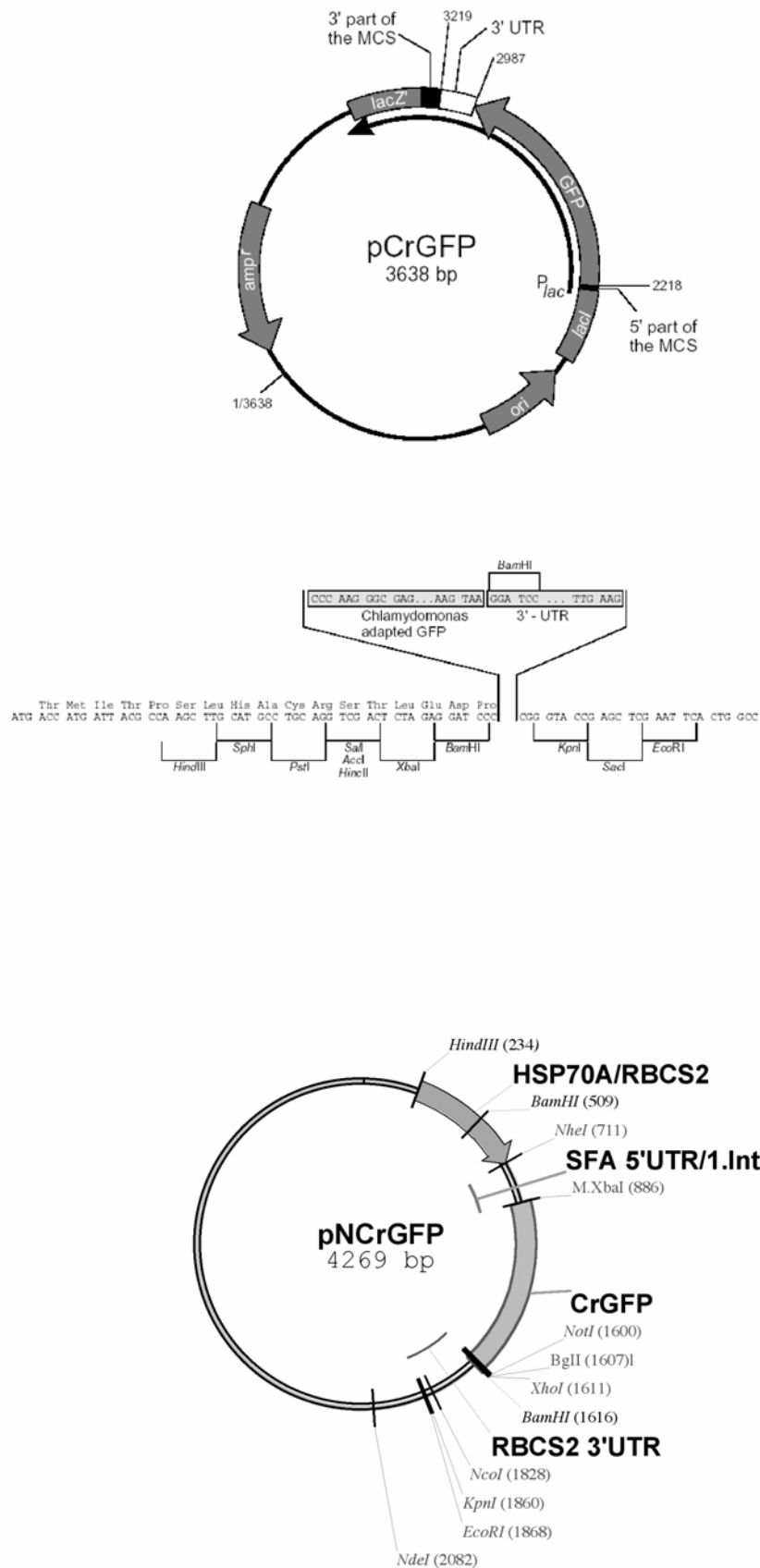
CenantiR1: 5'- CGC CAA GCT TAG GTC GAA TGC CTC GCG GAT C -3'

Nitfw: 5'- CCC AAG CTT TAT GCA CGC CAG GCT TGC GGT G -3'

Nitrev: 5'- TGC ACT GCA GCG TGT ATG GCT TTG GCT ACA AAG CAG -3'

Verwendete Vektoren:

Die Vektorkarten wurden mir freundlicherweise von Jutta Schoppmeier zur Verfügung gestellt.



Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. K.-F. Lechtreck für die interessante Themenstellung und für seine Betreuung, Diskussionsbereitschaft und die Hilfestellung während dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Jutta Schoppmeier für unsere Zusammenarbeit, ihre freundliche Hilfe bei Fragen jeder Art und nicht zuletzt für unsere gemeinsame Pausengestaltung.

Des weiteren möchte ich Frau Dr. Andrea Grunow für die Erstellung der Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie und Herrn Björn Podola für die fast uneingeschränkte Bereitschaft Probleme am Computer zu lösen, danken.

Danke auch an die Mitglieder der Arbeitsgruppen Melkonian und Bothe für ihre wertvolle Unterstützung in fachlichen Bereichen und für das schöne und harmonische Arbeitsklima. Der Arbeitsgruppe Weißenböck möchte ich darüber hinaus dafür danken, dass wir ihre Labore nutzen durften.

Nicht zuletzt gilt ein herzlicher Dank auch meiner Familie und meinen Freunden, die mit ihrer liebevollen Unterstützung und ihrem Vertrauen zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Priv.-Doz. Dr. K.-F. Lechtreck betreut worden.

Teilpublikationen: Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation

Journal of Cell Science 116; 2635-2646 (2003)

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Name: Bettina Koblenz

Schulausbildung:

1980-1982	Grundschule Schleiden
1982-1984	Grundschule Reifferscheid, Hellenthal
1984-1987	Clara-Fey-Gymnasium, Schleiden
1987-1993	Maximilian-Kolbe-Gymnasium, Köln- Porz
	Abschluss: Abitur

Studium:

WS 1993-SS 2001	Biologie, Universität zu Köln
	Abschluss: Diplom

Diplomarbeit:

07.2000-07.2001	Botanisches Institut der Universität zu Köln
-----------------	--

Promotionsstudium:

ab 09.2001	Botanisches Institut der Universität zu Köln unter Anleitung von Dr. K.-F. Lechtreck
------------	---

Beschäftigungen:

03.01.2000 bis 30.06.2001	studentische Hilfskraft, Institut für Entwicklungsbiologie
ab 17.09.2001	wissenschaftliche Mitarbeiterin, Botanisches Institut

Köln, den 25.04.04